

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:
**ESTUDIO ISOTÉRMICO DE BIOSORCIÓN DE CADMIO EN SOLUCIÓN
ACUOSA EMPLEANDO PERLAS DE ALGINATO CON *Chlorella* sp.
INMOVILIZADA**

AUTORA:
ANDREA JACQUELINE CARRASCO CARRASCO

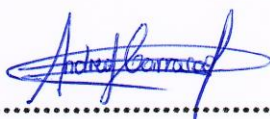
TUTORA:
MARÍA FERNANDA GUEVARA

Quito, julio del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Andrea Jacqueline Carrasco Carrasco con documento de identificación N° 0802271783 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy la autora del trabajo de titulación intitulado: “ESTUDIO ISOTÉRMICO DE BIOSORCIÓN DE CADMIO EN SOLUCIÓN ACUOSA EMPLEANDO PERLAS DE ALGINATO CON *Chlorella* sp. INMOVILIZADA”, el mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo el derecho moral de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....


Andrea Jacqueline Carrasco Carrasco

0802271783

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Estudio isotérmico de biosorción de cadmio en solución acuosa empleando perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada” realizado por Andrea Jacqueline Carrasco Carrasco, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, julio 2018


María-Fernanda Guevara Granja
Cédula de identidad: 1002454948

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación, está dedicado a mis padres y hermanos por su confianza y apoyo incondicional, a Tathy por sus enseñanzas en el principio de la carrera y por todo su cariño y paciencia que me brinda todo el tiempo.

Agradecimiento

A Dios por mostrarme su amor, fidelidad y por formar mi carácter durante esta etapa.

A mi tutora María Fernanda Guevara por su paciencia y predisposición para el proyecto de investigación, compartiendo sus conocimientos desinteresadamente.

A los docentes que contribuyeron en mi aprendizaje no solo profesional sino también humano.

A los ingenieros Edison Osorio y Marco Ibarra por su apoyo y colaboración en la parte experimental del proyecto, al ingeniero Christian Larenas y Daniel Acurio por sus asesorías con los resultados obtenidos del proyecto.

Índice

Introducción	1
Capítulo I.....	4
1. Marco conceptual	4
1.1 Microalgas.....	5
1.2 Biosorción	7
1.3 Alginato.....	12
1.4 Estudio isotérmico de biosorción.....	13
Capítulo II	18
2. Marco Metodológico	18
2.1 Obtención y cultivo del biosorbente (<i>Chlorella</i> sp.).....	18
2.2 Formación de perlas de alginato	18
2.3 Formación de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. Inmovilizada	19
2.4 Análisis del proceso de biosorción de cadmio	20
2.5 Determinación de la cinética de biosorción de cadmio por perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. y sin <i>Chlorella</i> sp.	21
2.6 Establecimiento del pH óptimo de la solución acuosa para la biosorción de cadmio.....	21
2.7 Establecimiento de la concentración celular óptima en las perlas de alginato para la biosorción de cadmio	22
2.8 Determinación de isothermas de biosorción de cadmio por el biosorbente de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	23
2.9 Estudio de la remoción de cadmio por biomasa de <i>Chlorella</i> sp. libre.	24
2.10 Prueba de viabilidad de <i>Chlorella</i> sp. sometida a soluciones acuosas de cadmio.....	24

Capítulo III.....	26
3. Resultados y discusión	26
3.1 Obtención y cultivo del biosorbente (células de <i>Chlorella</i> sp.).....	26
3.2 Formación de perlas de alginato con y sin <i>Chlorella</i> sp. Inmovilizada.....	27
3.3 Determinación del tiempo óptimo de contacto de cadmio con el biosorbente.....	27
3.4 Establecimiento del pH óptimo del cadmio en la solución.....	30
3.5 Establecimiento de la concentración celular óptima en las perlas de alginato para la biosorción de cadmio	34
3.6 Análisis Isotérmico del proceso de biosorción	36
3.7 Comparación de biosorción de cadmio entre perlas de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada, perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. libre.....	42
3.8 Prueba de viabilidad.....	44
Conclusiones	46
Recomendaciones.....	48
Referencias Bibliográficas	49
Anexos	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Adsorción de cadmio en soluciones a pH 5 y 6. Con una concentración inicial (C_i) de 20 mg/ mL de cadmio	31
Tabla 2 Adsorción de cadmio con densidades celulares de <i>Chlorella</i> sp. diferentes inmovilizadas en perlas de alginato y como control el tratamiento sin <i>Chlorella</i> sp. en las perlas de alginato, con una concentración inicial de 20 mg/ mL de cadmio.	34
Tabla 3 Bioadsorción de cadmio por perlas de alginato con y sin <i>Chlorella</i> sp. ajustando los datos a los modelos isotérmicos de Lagmuir y Freundlich.	38
Tabla 4 Comportamiento isotérmico según el factor adimensional RL de la isoterma de Langmuir, empleando perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.	38

Índice de Figuras

Figura 1: Perlas de alginato con y sin células de <i>Chlorella</i> sp.	27
Figura 2: Cinética de bioadsorción de cadmio	29
Figura 3: Isoterma de Langmuir para cadmio con <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada en perlas de alginato.....	39
Figura 4: Isoterma de Langmuir para Cd sin <i>Chlorella</i> sp. con perlas de alginato	39
Figura 5: Isoterma de Freundlich para Cd con perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	41
Figura 6: Isoterma de Freundlich para Cd sin <i>Chlorella</i> sp. con perlas de alginato ..	41
Figura 7: Bioremoción de cadmio con/sin biomasa inmovilizada y biosorbente con biomasa libre	44
Figura 8. Prueba de viabilidad	45

Índice de Anexos

Anexo 1: Células de <i>Chlorella</i> sp. en cámara de Neubauer.....	58
Anexo 2: Análisis estadístico del ensayo de tiempo de contacto.	59
Anexo 3: Prueba de rango post hoc de Tukey para el ensayo de tiempo óptimo de contacto	60
Anexo 4: Análisis estadístico del ensayo de pH.....	61
Anexo 5: Prueba de Tukey del ensayo de pH óptimo.	62
Anexo 6: Prueba de Tukey del ensayo de pH óptimo, comparando las variables de interacción	63
Anexo 7: Análisis estadístico del ensayo de concentración celular óptima.	64
Anexo 8: Análisis estadístico del ensayo de adsorción de cadmio con biomasa inmovilizada, biomasa libre y alginato sin biomasa.	65

Resumen

La contaminación de fuentes hídricas por metales pesados ha crecido proporcionalmente al aumento de la industrialización, por lo que han buscado soluciones con técnicas innovadoras para la remoción de dichos contaminantes, como es el uso de microalgas. En este trabajo se muestra el estudio isotérmico de biosorción de cadmio en solución acuosa empleando la microalga *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato. Para esto se determinaron las condiciones óptimas de remoción: tiempo de contacto, pH, concentración de células de *Chlorella* sp. y concentración del metal en la solución por medio de la cinética de biosorción. Las perlas, con una densidad de 3×10^7 cel/mL de alginato, fueron inoculadas en soluciones acuosas a las diferentes concentraciones de Cd utilizadas. Los datos experimentales de la bioadsorción de Cd con el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. se ajustaron favorablemente al modelo de Langmuir obteniendo una concentración máxima de retención de Cd (q_m) de 5,640 mg por gramo de perla de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada (biosorbente), a un tiempo óptimo de 223 min y a pH 5 (pH óptimo) mientras que para el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp., los datos experimentales de la bioadsorción de Cd se ajustaron favorablemente a los dos modelos de Langmuir y Freundlich, con un q_m de 5,356 mg por gramo de perla de alginato (biosorbente). Los dos tratamientos se podrían emplear para procesos de biorremediación con cadmio. Sin embargo, se espera que si se eleva la concentración celular de *Chlorella* sp. en las perlas se pueda incrementar la remoción de metal, empleando exitosamente en tratamientos de remoción de cadmio.

Palabras claves: *Chlorella*, inmovilización, alginato, isoterma, biosorción, cadmio.

Abstract

The pollution of water sources by heavy metals has grown proportionally to the rise of industrialization, so solutions have been sought with innovative techniques for the elimination of such pollutants, such as the use of microalgae. In this work is shown the isothermal study of cadmium biosorption in solution using the microalga *Chlorella* sp. immobilized in alginate beads. For this the optimal conditions of removal were determined: contact time, pH, cellular concentration of *Chlorella* sp. and concentration of the adsorbed metal. The experimental data of the bioadsorption of Cd with the treatment of alginate beads with *Chlorella* sp. it adapted favorably to the Langmuir model obtaining a maximum concentration of Cd retention (q_m) of 5,640 mg per gram of cotton pearl with *Chlorella* sp. immobilized (biosorbent), an optimal time of 223 minutes at pH 5 (optimum pH) while for the treatment of alginate beads without *Chlorella* sp., the experimental data of the Cd bioadsorption adjusted favorably to the two Langmuir models and Freundlich, with a q_m of 5.356 mg per gram of alginate bead (biosorbent). The two treatments can be used for bioremediation processes with cadmium. However, it is expected that the cellular concentration of *Chlorella* sp. In the pearls, the removal of metal can be increased, using successfully in cadmium removal treatments.

Keywords: *Chlorella*, immobilization, alginate, isotherms, biosorption, cadmium.

Introducción

La preocupación por la contaminación del ambiente con elementos tóxicos como los metales pesados producidos principalmente de las industrias agrícolas, metalúrgicas, textiles, plásticas, mineras y curtido de cuero han causado una serie de problemas ecológicos y sobre la salud humana (Plaza Cazón, 2012). La toxicidad de los metales pesados, radica en que al no ser química ni biológicamente degradables, se acumulan progresivamente en el organismo o pueden permanecer en el ambiente durante años (Sandoval, 2006).

Los efectos de los metales sobre los ecosistemas son una gran preocupación tanto económica como de salud pública. Por esto la remediación sobre todo de recursos hídricos contaminados con dichos elementos, se considera una prioridad, dando como resultado el estudio de tecnologías alternativas y sustentables donde disminuya el uso de productos químicos y favorezca el uso de organismos vivos o partes de ellos para beneficio del ser humano y su ambiente.

Existen métodos físicos, químicos y biológicos convencionales para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas, tales como: la oxidación, reducción, intercambio iónico, precipitación, filtración, tratamiento electroquímico, recuperación por evaporación y tecnologías de membrana (Plaza Cazón, 2012). Según Gupta & Saleh, (2013) cuando la concentración de los metales es muy baja, los procesos convencionales resultan caros y poco eficientes. Por eso dentro de la biotecnología existen técnicas para el tratamiento de contaminación de fuentes hídricas en especial con metales pesados tales como: la biosorción, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas

especializadas, derivadas de células microbianas (Villanueva, 2000). Estos procesos han permitido el uso de material vivo o partes de ellos para procesos de remediación, demostrado ser eficaces y eficientes.

Actualmente en Ecuador, según la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT, 2015), se han realizado estudios sobre biosorción de cadmio en aguas residuales de minería, utilizando residuos orgánicos como el bagazo de la caña de azúcar, el mesocarpio (fibra) del coco y la mazorca de maíz reportando resultados de remoción de 87,63 % ;88,32 % y 72,34 %, respectivamente. Así mismo la utilización de microalgas como técnica de remediación biológica ha prometido diversas aplicaciones tales como: la remoción de nutrientes de aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica, tratamiento de aguas residuales ácidas y con metales debido a su capacidad de transformación y degradación de sustancias tóxicas (Forero Montilla, 2015).

En la Universidad Politécnica Salesiana ya se ha realizado un análisis de remoción de cadmio por la acción de la microalga *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato donde obtuvieron una remoción del 59,67 % partiendo de una concentración inicial de 20 mg/L (ppm) del metal y un tiempo de 80 minutos (Perenguez Ortega & Valdez Álvarez, 2017). Sin embargo, aún no se han realizado estudios de biosorción y cálculos de isothermas con *Chlorella* sp. inmovilizada frente a soluciones acuosas con cadmio, lo que permite obtener un conocimiento más completo con respecto a la biorremoción de este metal utilizando la microalga *Chlorella* sp.

El presente proyecto de investigación tuvo como propósito el estudio isotérmico de biosorción de cadmio en una solución acuosa empleando la microalga *Chlorella* sp.

inmovilizada en perlas de alginato, determinando el efecto del pH y tiempo de contacto óptimos en la adsorción de Cadmio por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada a temperatura ambiente, preparando soluciones estándar de concentraciones de 1 a 20 mg/L (ppm) de cadmio, así como también se calculó la capacidad máxima de remoción de cadmio mediante modelos cinéticos isotérmicos de Lagmuir y Freundlich, corroborando los datos con un análisis estadístico con aplicación de la prueba de Dixon para discriminar datos atípicos y análisis de varianza corroborando los datos con una prueba de rango post hoc de Tukey.

Capítulo I

1. Marco conceptual

En la mayoría de los estudios recientes sobre la eliminación de metales pesados en efluentes, se informa que el cadmio es uno de los metales pesados más tóxicos y perjudiciales para los ecosistemas (Covarrubias & Cabriaes, 2017; Rubio, Delgado, & Amaya, 2017; Zhang, Zhao, Wan, Chen, & Bai, 2016).

El cadmio se encuentra en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos en el cinc, plomo y menas de cobre. No se encuentra en el ambiente como un metal puro (García & Cruz, 2012). Su masa atómica es 112,41; su punto de fusión es de 320,9 °C y su punto de ebullición es de 765 °C (Manchola, 2012). En cuanto a sus aplicaciones, se utiliza el en 9 % para pigmentos en galvanización, un 7 % en electrodeposición y como estabilizador de plásticos en 1,2 % (USGS, 2008). Además, puede encontrarse en los conductores eléctricos y en aleaciones con otros metales para incrementar la fuerza, la resistencia al uso, la plasticidad, o para bajar el punto de fusión (Mead, 2011).

Existen varios métodos convencionales que se han estudiado para el tratamiento de fuentes hídricas contaminadas con metales pesados las cuales son: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación (Diego Ivan Caviedes Rubio, Calderón, Gualtero, Acosta, & Sandoval, 2015). Sin embargo Villanueva, (2000) menciona que estos métodos resultan costosos e ineficientes, cuando la concentración de los metales es muy baja y en muchos casos el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Por otra parte, están los métodos

biológicos que permiten el uso de organismos y microorganismos vivos o inactivos que tienen la capacidad de adsorber, acumular, metabolizar o degradar compuestos tóxicos como los metales pesados (Diego Ivan Caviedes Rubio et al., 2015).

1.1 Microalgas

Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos que tienen un tamaño de 5–50 μm en promedio, convertidores de energía solar en energía química muy eficientes, de hecho cuatro veces superior a la de las plantas (Pérez & Marcus, 2015). Por esto, durante décadas, las microalgas han demostrado que pueden producir una gran variedad de metabolitos secundarios útiles para las industrias farmacéutica, alimentaria, nutracéutica, cosmetológica y biotecnológica (Guamán & González, 2016), (de-Bashan & Bashan, 2010).

La composición de la pared celular de las microalgas cumplen un papel muy importante a nivel ambiental ya que contienen grupos funcionales cargados negativamente lo que les hace ser afines a metales pesados (Monteiro, Castro, & Malcata, 2012). Constituyen mecanismos que les permiten producir moléculas peptídicas capaces de unirse a los iones de los metales formando complejos organometálicos, neutralizando el efecto tóxico de los metales dentro de la microalga (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Suresh Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin, (2015) menciona en su estudio que estos mecanismos permiten la retención de iones metálicos libres que se encuentran en las aguas donde está la microalga, causando una desintoxicación y remediación de la misma.

El cultivo de microalgas varía de una especie a otra cumpliendo parámetros fisicoquímicos óptimos de nutrientes, temperatura, salinidad, intensidad luminosa y pH (Pérez & Marcus, 2015). Según, Piotrowska-Niczyporuk, Bajguz, Zambrzycka, & Godlewska-Żyłkiewicz, (2012) afirman que los géneros de microalgas de elección para remediación de aguas contaminadas de metales son *Chlorella* y *Scenedesmus* ya que han sido utilizadas como biosorbentes de metales pesados tales como: K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V, Zn, As, Cd, Mo, Pb, Se y Al, soportando y adaptándose fisiológicamente al estrés por este tipo de contaminación.

1.1.1 Chlorella sp.

Es una microalga del tipo Chlorophytas, pertenecen al orden Chlorellales y a la familia Chlorellaceae.

Las células son esféricas, ovoides o elipsoidales, solitarias o formando colonias de hasta 64 células. El cloroplasto es en forma de copa o de plato, con o sin pirenoides, rodeado de granos de almidón, ausencia de flagelos. La reproducción se da por autosporas liberadas a través del rompimiento de la pared celular de la madre. La célula hija puede permanecer unida a los restos de la pared celular de la madre y forman colonias con recubrimiento mucilaginoso (Guamán & González, 2016). Presenta clorofila a y b en la misma proporción que las plantas causando el color verdoso característico. Sus principales pigmentos son los carotenos y xantofilas (Guamán & González, 2016). Además es considerado como un organismo ideal para acumular metales pesados en fuentes de agua (Wan Maznah, Al-Fawwaz, & Surif, 2012).

1.2 Biosorción

El término “biosorción”, se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico (Sandoval, 2006).

El prefijo “bio” hace referencia a que el sorbente es de origen biológico, por lo tanto la superficie de adsorción tiene una composición química- biológica determinada que dependerá del material biológico empleado (Plaza Cazón, 2012). El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido a una concentración final o en el equilibrio (Villanueva, 2000). La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener (Villanueva, 2000).

1.2.1 Mecanismos del proceso de biosorción de metales por algas

La biomasa viva y no viva de las microalgas tienen la capacidad de remover metales pesados en fuentes hídricas, de esto depende la selección de los mecanismos de remoción de metales en soluciones acuosas.

Los mecanismos del proceso de biosorción de metales por algas, dependen de factores como, tipo de especies de algas, composición química de la solución de

iones metálicos, el entorno predominante y otros factores que facilitan la biosorción (Monteiro et al., 2012)

La acumulación de metales pesados por microalgas comprende un proceso de dos etapas: una eliminación inicial (pasiva) rápida de metales por la célula, que ocurre en la superficie celular, y una etapa lenta que ocurre dentro la célula (Monteiro et al., 2012).

La primera fase (extracelular) no es una fase metabólica, es rápida y esencialmente reversible, se produce en células tanto vivas como muertas. Los iones de los metales pesados se adsorben a grupos funcionales presentes en la superficie de la célula mediante interacciones electrostáticas. Sin embargo, estos grupos difieren en su afinidad por el enlace de metal y especificidad. Este proceso incluye adsorción física, intercambio iónico, quimisorción, coordinación, quelación, microprecipitación, atrapamiento en la red estructural de polisacáridos y difusión a través de la pared celular y la membrana (Monteiro et al., 2012).

La segunda fase (intracelular) es un proceso lento dependiente del metabolismo por ende está restringido solo a las células vivas y usualmente es un proceso irreversible que permite el transporte de iones metálicos a través de la barrera de la membrana celular, produciendo una acumulación dentro de la célula, con unión a compuestos intracelulares. La membrana de la microalga que rodea a la célula es parcialmente lipofílica ya que está mediado por proteínas específicas pero la mayoría de los metales pesados son hidrófilos por ende su transporte incluye mecanismos como la unión covalente, la precipitación superficial, las reacciones redox, la cristalización en

la superficie de la célula o, más a menudo, la difusión en el interior de la célula (Monteiro et al., 2012).

1.2.2 Influencia del pH en la biosorción

El pH puede afectar la solubilidad y la toxicidad de los metales pesados en el agua; es quizás el parámetro más importante que influye en la adsorción de metales por la biomasa de microalgas, particularmente, influye tanto en los sitios de unión del metal de la superficie celular como en la química del metal en el agua (Indhumathi, Syed, Shoba, & Saraswathy, 2014).

La adsorción o sorción, es un proceso fisicoquímico por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material por medio de diferentes mecanismos (Cruz, 2013).

La adsorción es un proceso dependiente del pH, puesto que, a pH bajo, los sitios activos de la pared celular están asociados con protones, lo que resulta en una fuerza de repulsión a los cationes metálicos, permitiendo que a medida que aumenta el pH, la cantidad de sitios de la pared celular algal sean reemplazados por cargas negativas. Esto conduce a la atracción de los cationes metálicos y su posterior adsorción sobre la superficie de la célula (Perpetuo, Souza, & Nascimento, 2011). Por ende al aumentar el pH, sitios de la pared celular microalgal como: quitina de acetamida, polisacáridos estructurales, grupos fosfato, grupos amino, grupos carboxilo de proteínas y grupos hidroxilo de polisacáridos, se reemplazan por cargas negativas que aumentan la atracción de cationes metálicos y su adsorción a la superficie de la celda (Perpetuo et al., 2011), (Monteiro et al., 2012).

La precipitación de la mayoría de los metales tiende a ocurrir a niveles de pH más altos; disminuyendo el grado de remoción del metal, por lo tanto, es necesario determinar el pH óptimo para las interacciones alga-metal (Perpetuo et al., 2011).

1.2.3 Biosorción de metales por biomasa inmovilizada

El uso de biomasa viva inmovilizada es una opción llamativa para aplicar en las tecnologías alternativas de biorremediación de metales pesados a bajas y altas concentraciones. Los sistemas de algas inmovilizadas han sido probados por varios investigadores especialmente para procesos de desintoxicación y recuperación de metales incrementando los beneficios biotecnológicos del cultivo de las microalgas (Hameed y Ebrahim, 2007), (de-Bashan & Bashan, 2010).

Según Moreno-Garrido, (2008), la inmovilización de microorganismos puede darse por dos tipos: inmovilización activa e inmovilización pasiva. La inmovilización pasiva es un término que hace referencia a la unión celular a materiales adsorbentes los cuales pueden ser naturales o sintéticos como espuma de poliuretano y polivinilo (de-Bashan & Bashan, 2010).

La inmovilización activa hace referencia al atrapamiento en diferentes materiales como agentes floculantes, unión química y el atrapamiento de gel. Los agentes floculantes actúan cuando se pretende eliminar microorganismos de un medio líquido. Entre los floculantes comúnmente usados, el quitosano ha sido el más utilizado sin embargo se ha comprobado que este puede interferir en el crecimiento de algas inmovilizadas (Moreno-Garrido, 2008).

La interacción química depende del pH y la fuerza iónica de los medios circundantes para su efectividad. La unión mediante enlaces covalentes, pueden presentar una desventaja causando daños en la superficie celular y reduciendo la viabilidad de células por lo que esta técnica se usa más para inmovilizar organismos no vivos (Feksa et al., 2018).

El atrapamiento de gel se basa en el principio de mantener metabólicamente activas las células vivas dentro de una matriz de gel el mayor tiempo posible, tiempo durante el cual tienen una movilidad muy limitada. Se puede realizar mediante el uso de polisacáridos naturales (agares, carragenanos o alginatos) (de-Bashan & Bashan, 2010).

Según Monteiro et al., (2012) y Villanueva, (2000) afirman que el uso de polisacáridos naturales como inmovilizadores son los más recomendados para la biomasa algal debido a que disminuyen la toxicidad del metal al interactuar con las células vivas, destacando el alginato y carragenano como los soportes más comunes para las microalgas ya que presentan buena resistencia a la presión hidrostática y a la degradación mecánica.

En un estudio de Petrovič & Simonič, (2016), se informa que trabajar con microalgas inmovilizadas con alginato puede eliminar eficientemente los metales de Cu, Ni y Cd, probados de fuentes contaminadas de agua potable. Así mismo, Wan Maznah et al., (2012) afirma en su estudio que la capacidad de biosorción de *Chlorella* sp. inmovilizada para los iones de cobre y zinc fue más alta que el de la biomasa libre.

La inmovilización permite que la suspensión microbiana se mezcle con los monómeros macromoleculares del polímero. Esta mezcla se solidifica posteriormente para producir un gel polimérico de diversas formas, el cual se coloca directamente en el agua a tratar, dándole como beneficio concentrar una gran biomasa que puede usarse como subproducto, además tiene una alta resistencia a compuestos tóxicos dentro del agua residual, puede inmovilizar más de un microorganismo, es fácil de aplicar por los no profesionales y además el metal retenido por la biomasa puede luego ser desorbido para recuperar el metal y reutilizar la biomasa en ciclos de desorción múltiple (Monteiro et al., 2012), (de-Bashan & Bashan, 2010).

1.3 Alginato

El alginato es un biopolímero obtenido típicamente de algas marrones (Phaeophyceae), comprende un componente significativo hasta 40 % del peso seco de la biomasa algal seca (Lee & Mooney, 2012). El extracto se puede filtrar utilizando cloruro de sodio o calcio para precipitar el alginato (Lee & Mooney, 2012). La capacidad de adsorción de las algas está directamente relacionada con la presencia de los sitios de la pared celular debido a su tamaño, grado de solvatación, presencia de iones quelantes, tamices moleculares, intercambio iónico con especies presentes en el alga. (Monteiro et al., 2012), es por eso que la utilización de este biopolímero ha provocado la existencia de diversos estudios de inmovilización de microalgas con fines de purificación de fuentes hídricas contaminadas.

El alginato pertenece a la familia de los polisacáridos lineales compuestos por unidades de ácido 1,4 β -D manurónico (M) y α -L gulurónico (G) dispuestos de una manera irregular, coexistiendo las secuencias MM, GM, MG Y GG. Estas secuencias

les confiere la propiedad de melificarse en presencia de iones de calcio (II) y son las que actúan en la interacción con los iones metálicos (Cuizano & Navarro, 2008).

1.4 Estudio isotérmico de biosorción

Es un proceso que permite cuantificar la capacidad de un biosorbente específico para que se genere una sorción eficiente de metales en solución acuosa mediante las condiciones óptimas (Caizapanta A., 2012). Esto se realiza caracterizando el estado de equilibrio después de que el biosorbente ha reaccionado con una solución acuosa del metal de interés. La reacción se monitorea comúnmente midiendo la cantidad de metal que queda en la solución hasta que se vuelve invariante en el tiempo (Davis, Volesky, & Mucci, 2003).

Para el proceso de biosorción se utilizan modelos matemáticos llamados isotermas para describir los resultados de la unión de metales pesados al biosorbente, tomando en cuenta la masa de la muestra empleada y la relación de las concentraciones tanto iniciales como finales de los ensayos para determinar la máxima retención (Manchola, 2012).

$$q = \frac{(C_i - C_f) * V}{X_o} \quad \text{Ecuación 1: Concentración de biosorción del metal}$$

donde q es la concentración de biosorción del metal (mg de metal/ g de biosorbente), C_i representa la concentración inicial del metal en solución (mg/L), C_e es la concentración final del metal (en equilibrio) en solución (mg/L), V es el volumen de la solución (L) y X_o representa la cantidad de biosorbente agregada (g).

Las ecuaciones más usadas para demostrar los procesos de sorción en equilibrio son: isothermas de Freundlich e isothermas de Langmuir, ambas describen la relación entre la cantidad de soluto adsorbida por unidad de adsorbente con la concentración disuelta de la especie química a sorber (Manchola, 2012) (Caizapanta A., 2012).

1.4.1 Isothermas de Langmuir

La isoterma de Langmuir se ha usado tradicionalmente para cuantificar y comprobar el rendimiento de diferentes biosorbentes mediante una igualdad que revela el proceso de adsorción en un estado de equilibrio cuando las moléculas adsorbidas se distribuyen entre la fase líquida y la sólida, manteniendo una temperatura constante (Rivas, Núñez, Longoria, & Gonzalez, 2014).

$$q = \frac{b q_{max} C_e}{1 + b C_e} \quad \text{Ecuación 2: Isotherma de Langmuir}$$

donde, q es el metal retenido por gramo de biosorbente, C_e es la concentración en equilibrio, q_{max} es la constantes de Langmuir, relacionada con la máxima capacidad de sorción (mg/g) y b es la constante relacionada con la afinidad entre el sorbente y el sorbato (1/mg).

Langmuir estableció 3 postulados para describir la adsorción: 1) Formación de una monocapa de moléculas adsorbidas, 2) todos los sitios presentan la misma energía, son homogéneos y 3) no hay interacción entre moléculas adsorbidas (Sandoval-Ibarra, López-Cervantes, & Gracia-Fadrique, 2015).

En relación a la formación de una monocapa de moléculas adsorbidas, las isothermas de Langmuir corresponde a una adsorción de tipo I o adsorción en monocapa cuando la cantidad adsorbida aumenta hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie formando una monocapa (Sandoval, 2006).

Todos los sitios de la superficie tienen la misma probabilidad de ser ocupados, es así que las propiedades de la interfase como una región homogénea, indican que en la superficie existe una cantidad limitada de espacios con la misma probabilidad de ser ocupados (Sandoval-Ibarra et al., 2015).

Así mismo, no hay interacción entre moléculas adsorbidas, indica que cuando los cambios en las propiedades superficiales asociados a la adsorción de cada molécula son constantes, no existen interacciones entre las especies adsorbidas (Sandoval-Ibarra et al., 2015).

La ecuación linealizada de la isoterma de Lagmuir se representa graficando $1/q$ vs. $1/C_e$ mediante una regresión lineal con lo que se obtiene la ecuación $y=mx+b$, adquiriendo la siguiente relación (Manchola, 2012).

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_{max} \cdot b \cdot C_e} \quad \text{Ecuación 3: Isoterma de Langmuir linealizada}$$

donde, q_m representa la tasa máxima de retención del metal (mg de metal/g de biosorbente) y b es la constante relacionada con la afinidad del biosorbente por los iones del metal, siendo b la ordenada y su recíproco la tasa máxima de retención del metal.

Se puede evaluar la isoterma de Langmuir a partir de un factor adimensional R_L :

$$R_L = \frac{1}{1+bCe}$$

Ecuación 4: Factor adimensional isoterma Langmuir

El factor adimensional o parámetro de equilibrio R_L es una constante que indica la forma de la isoterma, determinando que, cuando $R_L > 1$ se considera que el sistema isotérmico no es favorable, cuando $R_L = 1$ el tipo de isoterma es lineal y $0 < R_L < 1$ el sistema isotérmico es favorable puesto que la sorción del metal es significativa y un valor de $R_L = 0$ es una isoterma irreversible (Rao, Ramesh, Rao, & Sessaiah, 2006; Rodriguez-Estupinan, Giraldo, & Moreno-Pirajan, 2010).

1.4.2 Isotermas de Freundlich

La ecuación de Freundlich representa la variación isotérmica de adsorción de una cantidad adsorbida por unidad de masa de adsorbente sólido (Manchola, 2012). La isoterma de Freundlich interpreta la sorción a superficies heterogéneas o superficies que soportan sitios de diversas afinidades (Davis et al., 2003). Específicamente, la isoterma de Freundlich se obtiene cuando se asume una distribución de afinidad logarítmica normal.

$$q = K * Ce^{1/n}$$

Ecuación 5: Isoterma de Freundlich

Donde K es la constante de capacidad de adsorción y n la constante de intensidad de adsorción (Lazo, Navarro, Sun-Kou, & Llanos, 2008).

La forma lineal de la isoterma de Freundlich se obtiene graficando $\log Ce$ vs. $\log q$ mediante una regresión lineal con lo que se obtiene la ecuación $y=mx+b$ y se utiliza la siguiente ecuación:

$$\log q = \left(\frac{1}{n}\right) \log Ce + \log K$$

Ecuación 6 Isoterma de Freundlich linealizada

donde n es una constante relacionada con la intensidad de sorción del biosorbente, varía entre 0 y 1 (Cruz, 2013). Siendo n el recíproco de la pendiente m y K es la constante de Freundlich relacionada a la capacidad de sorción del biosorbente. Siendo $\log K=b$. Por lo tanto para evaluar la isoterma de Freundlich mediante la afinidad y la capacidad de sorción del biosorbente se toma en consideración que: cuando $n>1$ hay afinidad significativa del biosorbente por el metal y cuando $K>1$ la capacidad de sorción del biosorbente es significativa (Manchola, 2012).

Capítulo II

2. Marco Metodológico

2.1 Obtención y cultivo del biosorbente (*Chlorella* sp.)

La microalga *Chlorella* sp. fue obtenida de los ceparios de Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. El mantenimiento de los cultivos se realizó en volúmenes de 1000 mL con un medio compuesto de: agua desionizada (obtenida de la purificadora marca Milipore modelo Direct-Q) y 3 mL/L de fertilizante Nitrofoska-completo (contiene: N, P, K₂O, Mg, S, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo), proporcionándoles aireación con bombeo de aire atmosférico permanente con bombas para peceras marca JAD modelo SE-314, con fotoperiodo de 12:12 horas mediante iluminación solar y temperatura ambiente de 24 ± 1 °C. Las mangueras y recipientes plásticos fueron esterilizadas por radiación UV durante 15 minutos. Adicionalmente, se fue registrando la cinética de crecimiento de la biomasa por conteo en cámara de Neubauer hasta alcanzar la fase estacionaria. A partir de eso se suministró fertilizante Nitrofoska-completo (3 mL/L) en presencia de un mechero.

2.2 Formación de perlas de alginato

Se disolvieron 2g de alginato de sodio de grado alimenticio (Loba Chemie, alta densidad) en 50 mL de agua ultra pura estéril. Formando una pasta totalmente homogénea y sin grumos ajustando el pH entre 7,8 – 8,0 con NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M según corresponda. Luego se toma 20 mL de la pasta por medio de una jeringuilla y se deja gotear lentamente en una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) previamente

preparada a una concentración de 1 % p/v; con agitación constante, lo cual permite la formación de las perlas de alginato. El diámetro promedio de las perlas fue de $3,0 \pm 0,5$ mm.

2.3 Formación de perlas de alginato con *Chlorella* sp. Inmovilizada

Se realizó un conteo de los cultivos de *Chlorella* sp. con cámara de Neubauer (Anexo 1) para poder calcular el volumen de cultivo necesario para la formación de perlas con tres concentraciones diferentes de la microalga: 3×10^6 ; $1,6 \times 10^7$; 3×10^7 cel/mL de alginato, las cuales se emplearon en distintos ensayos.

A continuación, se disolvió 2 g de alginato de sodio de grado alimenticio (Loba Chemie, alta densidad) en 50 mL de agua desionizada. Formando una pasta totalmente homogénea y sin grumos ajustando el pH entre 7,8 – 8,0 con NaOH 0,1 M y HCl 0,1 M según corresponda y adicionando las el volumen de cultivo correspondiente para alcanzar las concentraciones de *Chlorella* sp. indicadas anteriormente (3×10^6 ; $1,6 \times 10^7$; 3×10^7).

Luego se tomó 20 mL de la pasta por medio de una jeringuilla y se dejó gotear suavemente en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) previamente preparada a una concentración de 1 % p/v; con agitación constante, lo cual permite la formación de las perlas de alginato, el diámetro promedio de las perlas fue de $3,0 \pm 0,5$ mm.

Las esferas formadas se mantuvieron en la solución de CaCl_2 durante 30 minutos y posteriormente fueron lavadas con agua desionizada para eliminar restos de cloruro de calcio y se almacenaron en vasos de precipitación con agua desionizada.

2.4 Análisis del proceso de biosorción de cadmio

En todos los ensayos se estableció el mismo proceso de biosorción con iguales condiciones controladas y concentraciones de reactivos utilizados.

Se colocaron 15 mL de solución acuosa de 20 mg/mL de cadmio (Solución estándar de Cd 1000 mg/L diluido en HCl) en matraces Erlenmeyer de 100 mL y se añadió a cada matraz 1g de perlas de alginato sin *Chlorella* sp. o 1 g de perlas de alginato con *Chlorella* sp., según corresponda, con la densidad celular determinada (1 gramo de perlas representa aproximadamente 8-9 perlas de alginato con/sin *Chlorella* sp.).

Para el control negativo se colocaron 15 mL de agua desionizada con perlas de alginato con *Chlorella* sp. y en matraces diferentes se colocó agua desionizada y perlas de alginato sin *Chlorella* sp. De cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

Una vez preparados todos los tratamientos fueron colocados en una plancha de agitación a 125 rpm y con iluminación solar, la temperatura ambiente fue de 24 ± 1 °C, distribuyéndolos mediante un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA).

La bioadsorción del metal en la solución acuosa se determinó mediante el equipo de absorción atómica de aspiración directa marca VARIAN modelo Spectr AA55 usando flama aire-acetileno con lámpara de cadmio. Se prepararon soluciones estándares de cadmio de diferentes concentraciones: 1, 5, 10, 20 y 30 ppm de cadmio en balones de 100 mL para calibrar el equipo.

Finalmente, obtenidos los resultados del equipo de adsorción, se realizó una prueba de Dixon organizando los datos y sacando el promedio de las concentraciones finales de cadmio evaluado en cada tratamiento.

2.5 Determinación de la cinética de biosorción de cadmio por perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp.

Para determinar la cinética de biosorción de cadmio se prepararon las soluciones de cadmio y los controles establecidos anteriormente en el proceso de biosorción, colocando 1g de perlas de alginato sin *Chlorella* sp., y en otros matraces, 1g de perlas de alginato con *Chlorella* sp., con una densidad celular de 1.6×10^7 cel./mL,

Se tomaron muestras de 5 mL de la solución acuosa cada 20 minutos hasta observar la desorción del metal en la solución.

Una vez organizados los datos de la concentración final obtenidos se eliminaron los datos no concordantes mediante la prueba de Dixon obteniendo promedios en cada tiempo evaluado y se construyó la gráfica linealizada porcentaje de Adsorción de Cd vs tiempo, con la ecuación 3 resultante de la regresión lineal se despeja el valor de “x” tomando como valor de “y” a la concentración de cadmio más baja en la solución acusa determinada en el ensayo ($y=mx+b$). Y el valor de “x” determinó el tiempo de contacto óptimo para biosorción del metal con cada tipo de perla.

2.6 Establecimiento del pH óptimo de la solución acuosa para la biosorción de cadmio

Se evaluaron dos valores de pH (5,0 y 6,0) durante los minutos que se establecieron previamente como tiempo de contacto óptimo para biosorción de metal con cada tipo

de perla. Inicialmente se evaluaron diferentes niveles de pH, pero con valores mayores se observó la precipitación del metal y los valores más bajos perjudican a la microalga.

Se prepararon las soluciones de cadmio y los controles establecidos anteriormente en el proceso de biosorción, pero en este ensayo para ajustar las soluciones a los pH 5,0 y 6,0 con los buffers ftalato de potasio hidrogenado ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$) 0,1 M y fosfato de potasio dihidrogenado (K_2HPO_4) 0,1 M según corresponda y se procedió de igual manera que en el ensayo anterior, colocando a cada matraz 1g de perlas de alginato sin *Chlorella* sp., y en otros matraces, 1 g de perlas de alginato con *Chlorella* sp. (densidad celular de $1,6 \times 10^7$ cel/mL), y como control se colocaron tratamientos similares pero con agua desionizada sin metal.

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento y se analizaron las muestras durante el tiempo de contacto óptimo previamente establecido. Se construyó una tabla con los datos promedios seleccionados de la prueba de Dixon y se estableció el mejor pH de la solución para la adsorción del metal.

2.7 Establecimiento de la concentración celular óptima en las perlas de alginato para la biosorción de cadmio

En este ensayo se analizaron las tres densidades celulares de *Chlorella* sp. en las perlas de alginato: 3×10^6 ; $1,6 \times 10^7$ y 3×10^7 cel/mL en los factores óptimos (tiempo de contacto y pH) previamente obtenidos con tres repeticiones para cada tratamiento y el control.

Se prepararon los tratamientos con las soluciones de cadmio y los controles establecidos anteriormente en el proceso de biosorción, se añadieron las perlas y a continuación se obtuvo el promedio de las concentraciones de cadmio por cada densidad celular de *Chlorella* sp. evaluado en cada tratamiento. Con esta información se construyó una tabla con los datos promedios seleccionando la mejor densidad celular de *Chlorella* sp. para la adsorción del metal.

2.8 Determinación de isothermas de biosorción de cadmio por el biosorbente de *Chlorella* sp. inmovilizada.

Para realizar las isothermas de biosorción se prepararon soluciones de 5,0; 10,0 y 20,0 mg/L de cadmio, se adicionaron las perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. y se seleccionó la concentración óptima de cadmio para la adsorción con el biosorbente utilizado, es decir aquella concentración en la que hay mayor porcentaje de adsorción. Se realizaron los ensayos con el tiempo, pH y concentración celular previamente determinados como óptimos.

Una vez obtenidos los promedios de las concentraciones de cadmio evaluados en cada tratamiento se aplicaron las ecuaciones de las isothermas de Langmuir y Freundlich para analizar la remoción de Cd por biosorción a fin de tener una descripción razonable del equilibrio entre la cantidad adsorbida y el resto en solución, determinando la concentración máxima de adsorción de cadmio por cada gramo del biosorbente utilizado y la afinidad entre el sorbato y adsorbente.

2.9 Estudio de la remoción de cadmio por biomasa de *Chlorella* sp. libre.

Se prepararon soluciones de 0, 5, 8, 11, 14, 17 y 20 mg/L de cadmio, de los cuales se tomaron 3 mL de solución respectivamente ajustando el pH de las soluciones al pH óptimo y se dispensaron en tubos de ensayo. Se colocó un inóculo de *Chlorella* sp. libre que permita alcanzar la misma densidad celular determinada como óptima para los tratamientos de biosorción de perlas de alginato con *Chlorella* sp., manteniendo agitación constante a 125 rpm, e iluminación y temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo determinado como óptimo para los procesos de biosorción con perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp., los tubos se sometieron a centrifugación y la concentración de cadmio presente en el sobrenadante fue leída mediante el espectrofotómetro de absorción atómica de aspiración directa. Los ensayos se realizaron por triplicado. Con los datos de la concentración final adquiridos, se realizó una prueba de Dixon, obteniendo el promedio de las concentraciones de cadmio evaluado en cada tratamiento.

2.10 Prueba de viabilidad de *Chlorella* sp. sometida a soluciones acuosas de cadmio.

Se realizaron pruebas de viabilidad de *Chlorella* sp. a todas las perlas de alginato con microalgas que se emplearon en los tratamientos para la determinación de isothermas de biosorción de cadmio por el biosorbente de *Chlorella* sp. inmovilizada.

Los ensayos se realizaron por triplicado, para esto se prepararon tubos de ensayo con medio de cultivo estéril con agua desionizada y 3 mL /L de Nitrofoska completo. Se

colocaron aquí las perlas previamente filtradas de la solución acuosa con cadmio, para la filtración se emplearon gasas estériles.

Se determinó la viabilidad de acuerdo a la coloración de las perlas durante 10 días, el cambio de coloración a un verde más intenso indicaría en aumento de densidad celular en las perlas, lo que evidenciaría la viabilidad de la microalga.

Capítulo III

3. Resultados y discusión

3.1 Obtención y cultivo del biosorbente (células de *Chlorella* sp.).

Partiendo de cultivos con $5,37 \times 10^5$ cel/mL se analizó la cinética de crecimiento de la microalga, se alcanzó la fase estacionaria a partir del día 34 con una densidad celular de $7,73 \times 10^7$ cel/mL. Esto gracias a las condiciones ambientales controladas en el laboratorio. Adicionalmente, el crecimiento y la división celular fueron afectados por la intensidad de la luz y el fotoperíodo (horas de iluminación y oscuridad), 690 ± 120 luxes en promedio, en relación también a la temperatura (24 ± 1 °C) en el día, es así que *Chlorella* sp. crece bien en condiciones de temperatura ambiente y luz solar. Se ha demostrado que la producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura (Ortiz- Moreno, Cortés - Castillo, Sánchez-Villarraga, Otero-Paternina, & Padilla, 2012), llegando a obtener una temperatura e intensidad de luz óptima entre 20-35 °C y 240 a 1024 lux respectivamente (Hernández-Pérez & Labbé, 2014) (Luz, Velasco, Helena Barros-Gómez, Ospina, & Alberto Trujillo, 2009).

Dado que Ecuador ofrece un fotoperiodo de 12:12 horas, permite un crecimiento favorable para el cultivo de la microalga *Chlorella* sp. La fotosíntesis de las microalgas es saturada a niveles lumínicos sobre el 30 % de la radiación total que la tierra recibe del sol (Gaviño & Stephanie, 2016). A demás las microalgas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila de sus células (Ruiz Martínez, 2011) (Stephens et al., 2010).

3.2 Formación de perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. Inmovilizada

Una vez obtenidas las perlas de alginato, se realizó un control de calidad de acuerdo a la forma y tamaño, descartándose las que no fueron totalmente esféricas, es decir las que presentaban una cola de alginato por la irregularidad al gotear la pasta de alginato en la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) de manera que se trabajó con perlas de tamaño y forma homogénea con el diámetro promedio de $3,0 \pm 0,5$ mm como se observa en la figura 1.



Figura 1: Perlas de alginato con y sin células de *Chlorella* sp.

Nota: Almacenamiento de perlas de alginato en agua desionizada. Izq. perlas de alginato sin *Chlorella* sp; Der. perlas de alginato con *Chlorella* sp.

Elaborado por: La Autora, (2018)

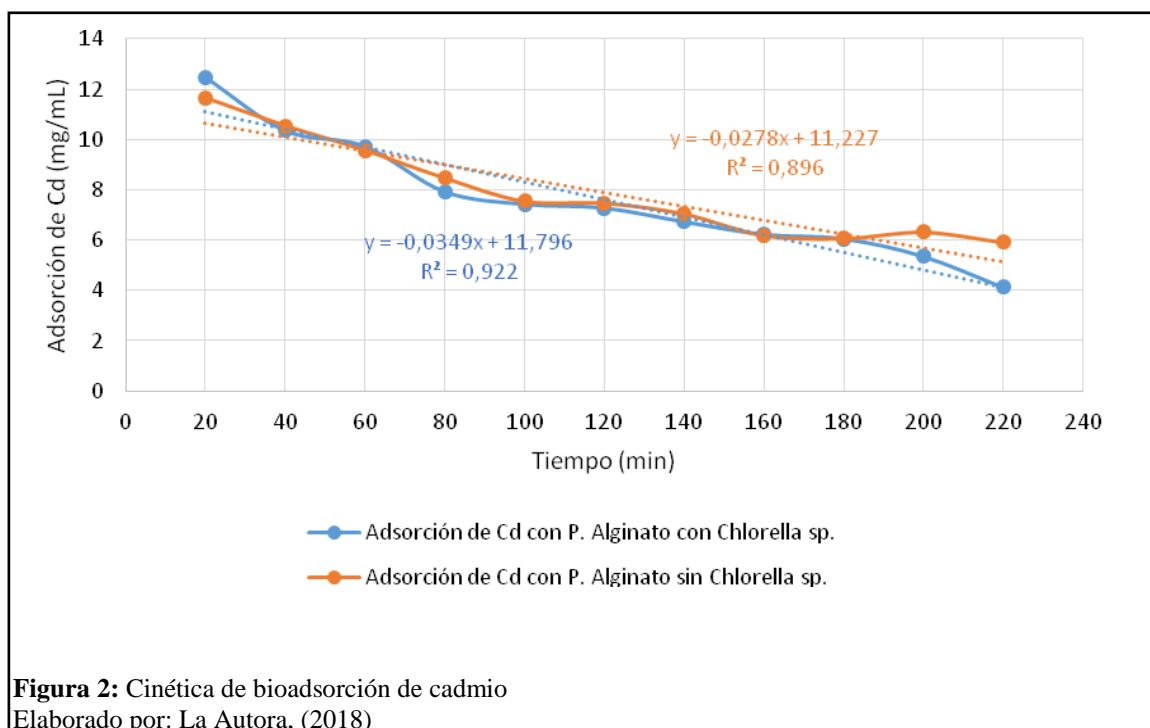
3.3 Determinación del tiempo óptimo de contacto de cadmio con el biosorbente

Se analizaron las concentraciones del metal en la solución acuosa cada 20 minutos a partir de la colocación de las perlas en la solución, hasta que inició el proceso de

desorción. Los valores obtenidos de cada una de las tres repeticiones fueron promediados y analizados mediante una prueba de Dixon eliminando datos discordantes según el criterio de rechazo de la prueba.

La figura 2 muestra la cinética de bioadsorción, tiempo vs. concentración de adsorción de cadmio con perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. Se observa que en los primeros 20 minutos la capacidad de adsorción del tratamiento utilizando como biosorbente perlas de alginato sin *Chlorella*, es mayor (9 mg/mL aproximadamente) que el tratamiento con *Chlorella* sp. (7 mg/mL aproximadamente). A continuación, en cada intervalo de tiempo se observa una adsorción análoga de los dos tratamientos y posteriormente va disminuyendo la velocidad de adsorción. A partir del minuto 200 se puede observar una divergencia en las concentraciones adsorbidas, obteniendo una mayor cantidad de adsorción con el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* y el tratamiento de alginato sin *Chlorella* sp. inicia a mantenerse constante.

La menor concentración de cadmio en la solución fue de 4,13 mg/mL y este se dio con el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. con la ecuación resultante de la regresión lineal ($y=mx+b$) se determinó que el tiempo óptimo de adsorción para el tratamiento con *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato es al minuto 223. Al minuto 240 se observó la desorción del metal.



Siguiendo el mismo procedimiento, en el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp., se determinó que en el minuto 188 se obtuvo la menor concentración del metal en la solución que fue de 5,93 mg/mL de cadmio. Al minuto 240 se observó la desorción del metal, de esta manera se determinó como tiempo óptimo de contacto 188 min para el tratamiento sin *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato.

Estos datos confirman que el uso de los dos biosorbentes actúan en soluciones contaminadas con cadmio removiendo el metal, es así que a medida que continua el proceso de adsorción, el sorbente alcanza el estado de saturación (tiempo óptimo de contacto) produciendo que posterior a este tiempo, el sorbente libere al soluto sorbido hacia la solución (Edris, Alhamed, & Alzahrani, 2014).

El análisis de adsorción demostró que las perlas de alginato con células de *Chlorella* sp. adsorben mayor concentración de metal que las perlas de alginato sin *Chlorella* sp.

sp., durante el tiempo óptimo para cada uno de los tratamientos. El tiempo óptimo de contacto es menor para las perlas de alginato sin *Chlorella* sp, (188 min) que para las perlas de alginato con *Chlorella* sp. (223 min), estos dos valores de tiempo serán tomados en cuenta para realizar el siguiente ensayo. Así mismo estos datos concuerdan con una investigación sobre la inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* en alginato de calcio (Forero-Cujiño, Ruiz, Pinilla-Agudelo, & Muñoz, 2016), aquí se demostró que la combinación del polímero del alginato con las microalgas funcionan con mayor eficiencia ya que estas, se distribuyen uniformemente dentro de la matriz de alginato potenciando la adsorción del soluto.

A demás en este ensayo también se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el software estadístico Infostat versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008) con un nivel de significancia del 95 %, (Anexo 2).

El análisis indicó que, si hubo diferencia significativa en cuanto a los tratamientos, obteniendo un $p < 0,05$ y posterior a esto se realizó una prueba de rango post hoc de Tukey utilizando como variables de clasificación el tiempo y la presencia o ausencia de *Chlorella* en los tratamientos y la interacción entre ambas variables (Anexo 3). Lo cual determinó que la adsorción de las perlas de alginato con *Chlorella* sp. es el mejor tratamiento de acuerdo a su media (16,18).

3.4 Establecimiento del pH óptimo del cadmio en la solución

La biosorción de iones metálicos en biosorbentes es un proceso dependiente del pH (Tüzün et al., 2005). En la tabla 1, se puede observar los resultados resumidos del

ensayo realizado, partiendo de una concentración inicial (Ci) de 20 mg/mL de cadmio.

Tabla 1. Adsorción de cadmio en soluciones a pH 5 y 6. Con una concentración inicial (Ci) de 20 mg/mL de cadmio.

Biosorbente	pH	Tiempo (min)	Adsorción de Cd (mg/mL)
Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. en solución de Cd	5	188	11,9
		223	12,7
	6	188	12,3
		223	12,6
Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. en solución de Cd	5	188	12,1
		223	12,4
	6	188	11,9
		223	12,1

Nota: Ensayo de bioadsorción de cadmio mediante las perlas de alginato con biomasa de la microalga y perlas de alginato sin biomasa. El ensayo fue establecido durante los tiempos 188 y 223 min. Elaborado por: La Autora, (2018)

Como se puede observar en la Tabla 1, la mayor concentración de adsorción del metal es de 12,7 y 12,6 mg/mL, con el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. en soluciones con pH 5 y 6 respectivamente, a 223 min esto demuestra que la capacidad de adsorción de cadmio no varía de acuerdo al pH de la solución sin embargo en el ensayo práctico la solución de cadmio a pH 6 pasados los 223 minutos comenzó a precipitarse, lo cual demuestra que la solución no es estable a ese nivel de pH y es confirmado con el estudio de Khan et al., (2015) donde menciona que las soluciones de Cd actúa con mayor eficacia en un rango de pH bajo (3,5 - 5), y

argumenta que a valores mayores de pH 6, los iones de Cd tienen una tendencia a precipitar. Además, a pH 5 – 5,5 se forman especies complejas de metales bastante estables con alginato y pectato (Cataldo et al., 2013). Así mismo Petrovič & Simonič, (2016) trabajó con pH5 en soluciones con Cu, Ni y Cd utilizando *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en perlas de alginato y obtuvo un porcentaje de retención de los metales de 84,16; 41,58 y 64,61 % respectivamente.

También se observa que a los 188 min los resultados de la adsorción del metal por el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp. son menores en comparación de los 223 min, por ende se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, con el software estadístico Infostat versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008) dando como resultado que si existe diferencia significativa entre los tratamientos con y sin *Chlorella* sp. en la perlas ($p < 0,05$) (Anexo 4).

También se realizó otro ANOVA para analizar las variables de clasificación que intervienen en el ensayo (tiempo, pH y la presencia o ausencia de *Chlorella* sp. en las perlas de alginato) de manera independiente, incluyendo las interacciones de dichas variables para determinar su influencia entre los tratamientos (Anexo 4), observando que con respecto a la presencia o ausencia de *Chlorella* sp. en las perlas, si existe diferencia significativa en la adsorción ($p < 0,05$).

Además se realizó una prueba de Tukey comparando los tratamientos con presencia y ausencia de la microalga inmovilizada en perlas de alginato, donde el tratamiento con *Chlorella* sp. presenta mayor adsorción que el tratamiento de perlas sin *Chlorella*, de acuerdo a la media (12,38) (Anexo 5).

Con respecto al pH de las soluciones no hay diferencia significativa (Anexo 5) pero con respecto al tiempo si hay diferencia significativa (Anexo 5), esto demuestra que los dos tratamientos actúan de la misma forma en las dos soluciones de pH (5 y 6) pero lo que les permite diferenciarse en la cantidad de adsorción es el tiempo, esto se confirma con la media obtenida (12,65) de la interacción entre *Chlorella* y tiempo (Anexo 6). Estos resultados pueden atribuirse a los grupos funcionales de los sitios activos de la microalgas ya que poseen una adsorción selectiva dependientes del pH de la solución pero a mayor tiempo de contacto mayor será la cantidad de retención de la solución adsorbida (Aksu & Dönmez, 2006). Los sitios activos de la pared celular de la microalga, están formados por grupos funcionales que permiten la unión a cationes metálicos en distintos intervalos de pH, como los grupos carboxilo que forman parte de la membrana de las microalgas y tienen una afinidad a pH 2-5 (Monteiro et al., 2012) (Edris et al., 2014).

En la interacción entre el pH y el tiempo no muestra diferencia significativa ($p > 0,05$) sin embargo en el análisis de Tukey se demuestra que el mejor resultado se obtiene a 223 min con una solución de pH 5 de acuerdo a la media (12,55) (Anexo 6).

Por último, en la interacción entre las tres variables (presencia o ausencia de *Chlorella* sp., tiempo y pH) se observa que no hay diferencia significativa, no obstante, en la prueba de Tukey el mejor tratamiento es, perlas de alginato con *Chlorella* sp. a pH 5 durante 223 min con una media de 12,73 (Anexo 6).

De acuerdo a estos análisis se demuestra que si hay diferencia significativa entre los tratamientos con y sin *Chlorella* sp. en las perlas con respecto al pH de la solución. Así mismo la concentración de adsorción en soluciones con pH 5 es mayor y más

estable que las de pH 6, por lo que se consideró al pH 5 como el pH óptimo para la adsorción de cadmio, y en los siguientes ensayos se trabajaron con este pH.

3.5 Establecimiento de la concentración celular óptima en las perlas de alginato para la biosorción de cadmio

Según los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 2, los valores de adsorción del metal van desde 13,9 hasta 14,5 mg/mL. La presencia de *Chlorella* sp. en las perlas muestra que hay mejor adsorción, de hecho mientras mayor sea la densidad celular de *Chlorella* sp. mayor es la concentración de adsorción del metal. Esto puede atribuirse a que a una mayor densidad celular existe un mayor número de sitios de unión del biosorbente (Monteiro et al., 2012).

Tabla 2 Adsorción de cadmio con densidades celulares de *Chlorella* sp. diferentes inmovilizadas en perlas de alginato y como control el tratamiento sin *Chlorella* sp. en las perlas de alginato, con una concentración inicial de 20 mg/mL de cadmio.

Biosorbente	Densidad celular (cel/mL)	Tratamiento	Ce (mg/L)	Adsorción de Cd (mg/mL)
	3×10^6	1	6,4	14,0
Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. en solución de Cd	$1,6 \times 10^7$	2	6,1	14,3
	3×10^7	3	5,9	14,5
Perlas alginato sin <i>Chlorella</i> sp. en solución de Cd	0	0	6,75	13,9

Nota: Los valores de concentración final (Ce) fueron promediados del análisis estadístico de Dixon. El ensayo fue establecido durante el tiempo óptimo de contacto (223 min.) y a pH óptimo (5 pH).
Elaborado por: La Autora, (2018)

La concentración de *Chlorella* sp. de 3×10^7 cel/mL captó una mayor cantidad de cadmio adsorbido (14,5 mg/mL) a comparación de las otras densidades celulares, sin embargo comprobando con el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 % en el software estadístico Infostat versión 2008, se confirma que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con y sin *Chlorella* sp. en la perlas ($P > 0,05$) (Anexo 7). Además, se realizó otro ANOVA solo para las concentraciones celulares de *Chlorella* sp., resultando que si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) y con la prueba de Tukey se determina que el mejor tratamiento es el de mayor concentración celular (3×10^7) (Anexo 7), por lo tanto se espera que si se incrementa la concentración celular por encima de 3×10^7 haya mayor adsorción del metal, de manera que sumada a la acción de remoción del alginato estarían actuando las células, de hecho Forero-Cujiño et al., (2016) afirma que a densidades celulares altas inmovilizadas en alginato se produce una mayor absorción de metales, como en el caso de *Azospirillum brasilense*, inmovilizada en conjunto con la microalga *Chlorella vulgaris*, mostrando una mayor eficiencia en la eliminación del contaminantes de nitrógeno y fósforo en aguas residuales así mismo, Ortiz- Moreno et al., (2012) trabajó con *Chlorella sorokiniana* con una densidad celular máxima de $86,5 \pm 0,75 \times 10^7$ células/mL obteniendo buenos resultados de adsorción. La acumulación de metales pesados por microalgas comprende un proceso de dos etapas: una eliminación inicial (pasiva) rápida de metales por la célula, que ocurre en la superficie celular en donde los iones de los metales pesados se adsorben a grupos funcionales presentes en la superficie de la célula mediante la afinidad de iones e interacciones electrostáticas, y una etapa lenta que ocurre dentro la célula (Plaza Cazón, 2012).

3.6 Análisis Isotérmico del proceso de biosorción

El mecanismo de biosorción de cadmio por las perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada y por perlas de alginato sin microalga se realizó mediante modelos matemáticos de isothermas de adsorción para expresar las propiedades y afinidad del biosorbente mediante los datos experimentales de equilibrio del sistema de biosorción. Los modelos utilizados de isothermas fueron Langmuir y Freundlich, para predecir la eficiencia de biosorción y el potencial del adsorbente.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de las curvas de las isothermas de Langmuir y Freundlich. En la figura 3 y figura 4 se observan las isothermas de Langmuir para el tratamiento con perlas de alginato con *Chlorella* sp. y el tratamiento con perlas de alginato sin *Chlorella* sp respectivamente. El proceso de biosorción describe los resultados de la unión de metales pesados al biosorbente, tomando en cuenta la masa de la muestra empleada (q_e) y la masa del soluto absorbido para la solución en equilibrio (C_e) y la relación de las concentraciones tanto iniciales como finales de los ensayos (ecuación 1) (Manchola, 2012), por ende la capacidad máxima de adsorción (q_m) son 5,640 mg de Cd por cada gramo de perla de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada, y 5,356 mg de Cd por cada gramo de perla de alginato sin *Chlorella* sp.

Analizando estos resultados se puede observar que existe una adsorción física causada por fuerzas de Van der Waals o electrostáticas entre las moléculas del sorbato (Cd) y los átomos que componen la superficie de las perlas de alginato (adsorbente) pero también ocurre una quimisorción cuando el metal se une a la superficie mediante fuerzas covalentes recubriendo totalmente con una sola capa de

moléculas adsorbidas hasta que queda saturada, después ocurre adsorción adicional sobre la capa presente. Por eso Langmuir insistió en que la quimisorción incluye la formación de una capa unimolecular, pero la fisisorción (Freundlich) puede dar origen a capas adicionales (García-Rojas, Villanueva-Díaz, Campos-Medina, & Velázquez-Rodríguez, 2012).

Los valores de la constante de equilibrio de biosorción (b) resultaron similares en los dos tratamientos (0,187 L/mg en perlas de alginato sin *Chlorella* sp. y 0,177 L/mg en perlas de alginato con *Chlorella* sp.) indicando que hay afinidad por los sitios de unión en este sustrato bajo un modelo de adsorción monocapa (Singh, Pavankumar, Lakshmanan, & Rajarao, 2012). Es así que, la superficie del bioadsorbente contiene un número finito de sitios que es la cantidad máxima que ocupa el ion metálico por unidad de peso del alginato para formar una monocapa completa en la superficie (Al-Qodah et al., 2017; Prasanna Kumar, King, & Prasad, 2007).

Los valores de correlación de los coeficientes (R^2) obtenidos de las curvas de las isothermas, muestran que la biosorción en el caso del tratamiento con *Chlorella* sp. inmovilizadas en perlas de alginato se ajusta al modelo de Langmuir con $R^2=91,2\%$, mientras que para Freundlich presentó un $R^2=89,8\%$; mientras que el tratamiento con perlas de alginato sin *Chlorella* sp. se ajusta a los dos modelos de Lagmuir y Freundlich con $R^2=92,9\%$ y $R^2=91,8\%$, respectivamente.

También se evaluó la isoterma de Langmuir a partir del factor adimensional R_L mediante la ecuación 4, donde se expresa un comportamiento isotérmico favorable ($0 < R_L < 1$) puesto que la sorción del metal es significativa para ambos tratamientos como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 3 Bioadsorción de cadmio por perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. ajustando los datos a los modelos isotérmicos de Lagmuir y Freundlich.

Modelo de Isoterma	Constantes de Isotermas	Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp.	Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.
Langmuir	q_m	5,640	5,356
	b	0,177	0,187
	R^2	0,912	0,929
Freundlich	K_F	1,468	1,620
	n	1,288	1,639
	R^2	0,899	0,918

Nota: La capacidad máxima de adsorción (q_m) está representada por (mg de Cd/g de perlas), la constante de equilibrio de biosorción (b) en (L/mg).
Elaborado por: La Autora, (2018)

Tabla 4 Comportamiento isotérmico según el factor adimensional RL de la isoterma de Langmuir, empleando perlas de alginato con *Chlorella* sp. y perlas de alginato sin *Chlorella* sp.

Ci (mg/mL)	RL	
	Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp.	Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.
5,00	0,167	0,167
8,00	0,111	0,111
11,00	0,084	0,084
14,00	0,066	0,066
17,00	0,055	0,055
20,00	0,048	0,048

Nota: Concentración inicial de cadmio (Ci). La biosorción del metal fue analizada en los factores óptimos establecidos (pH5, 223min.). El factor adimensional (RL) están entre 0 y 1.
Elaborado por: La Autora, (2018)

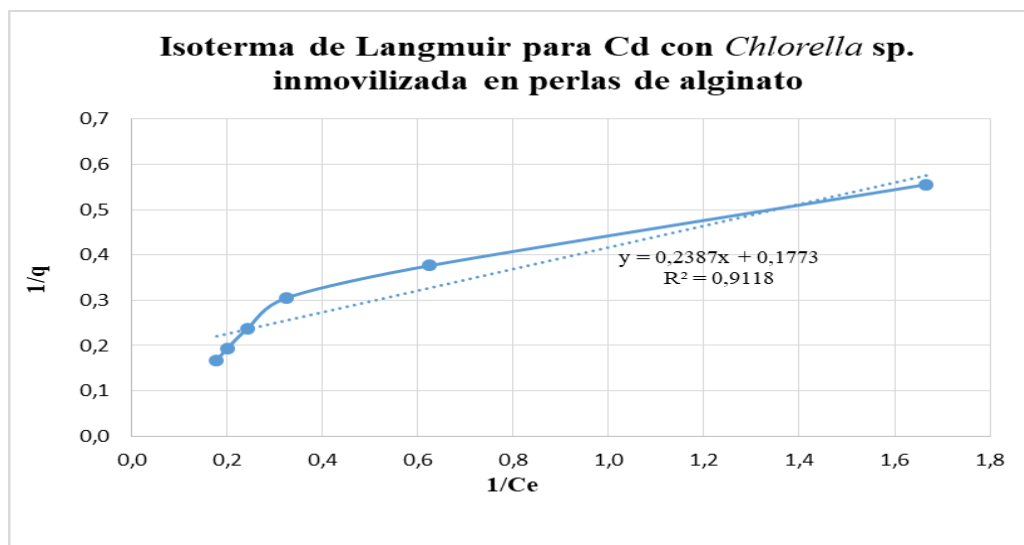


Figura 3: Isoterma de Langmuir para cadmio con *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato
Nota: La biosorción se dio en concentraciones iniciales de (5; 8; 11; 14; 17; 20) mg/mL de Cd durante 223 min., a pH5.
 Elaborado por: La Autora, (2018)

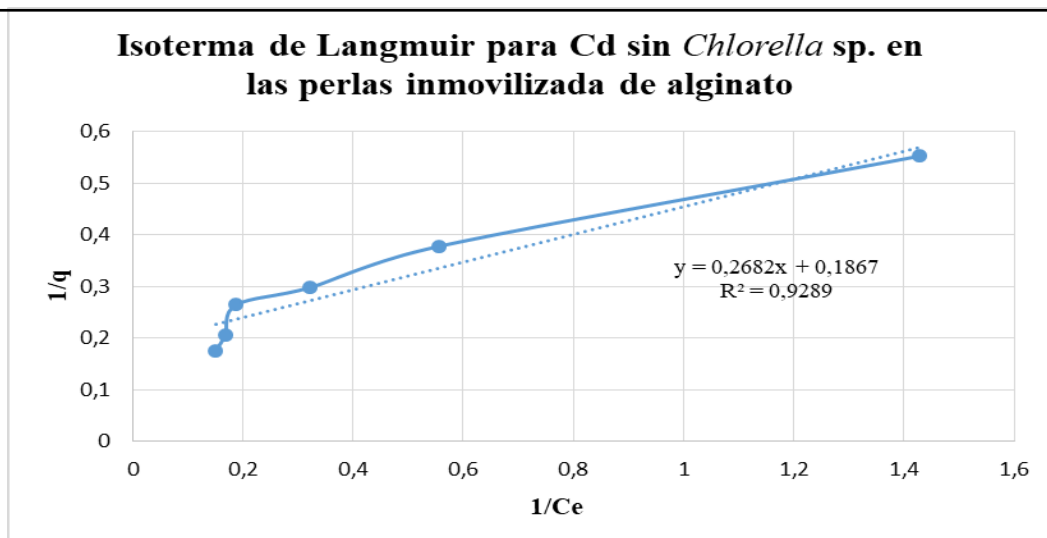
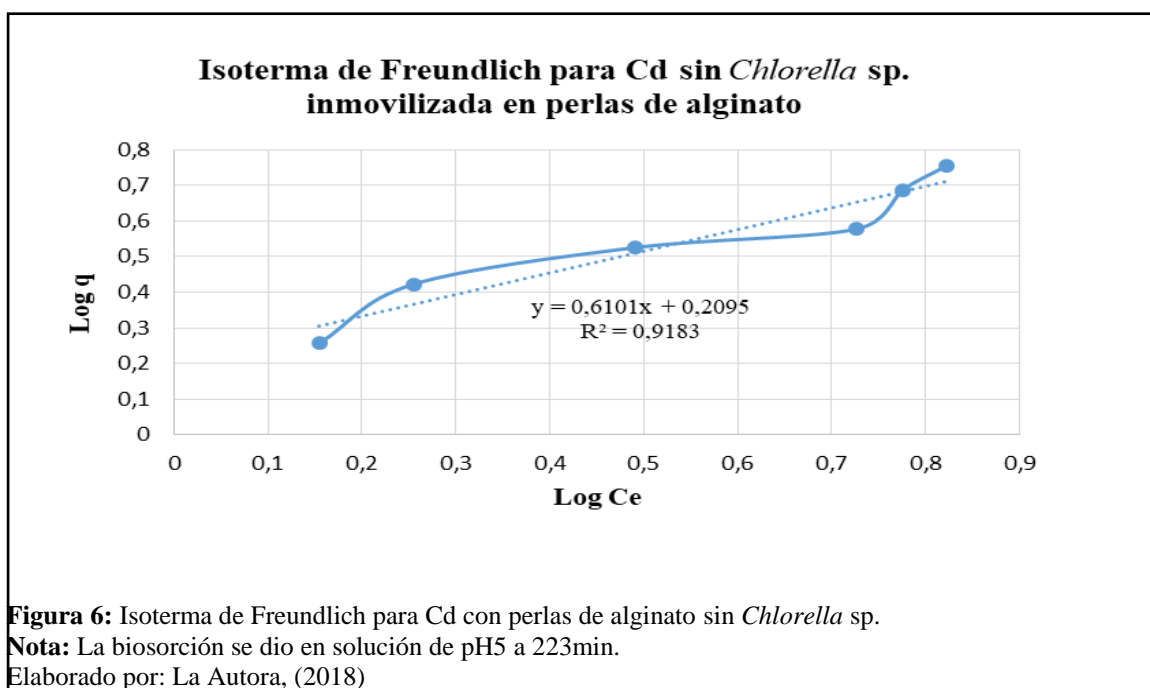
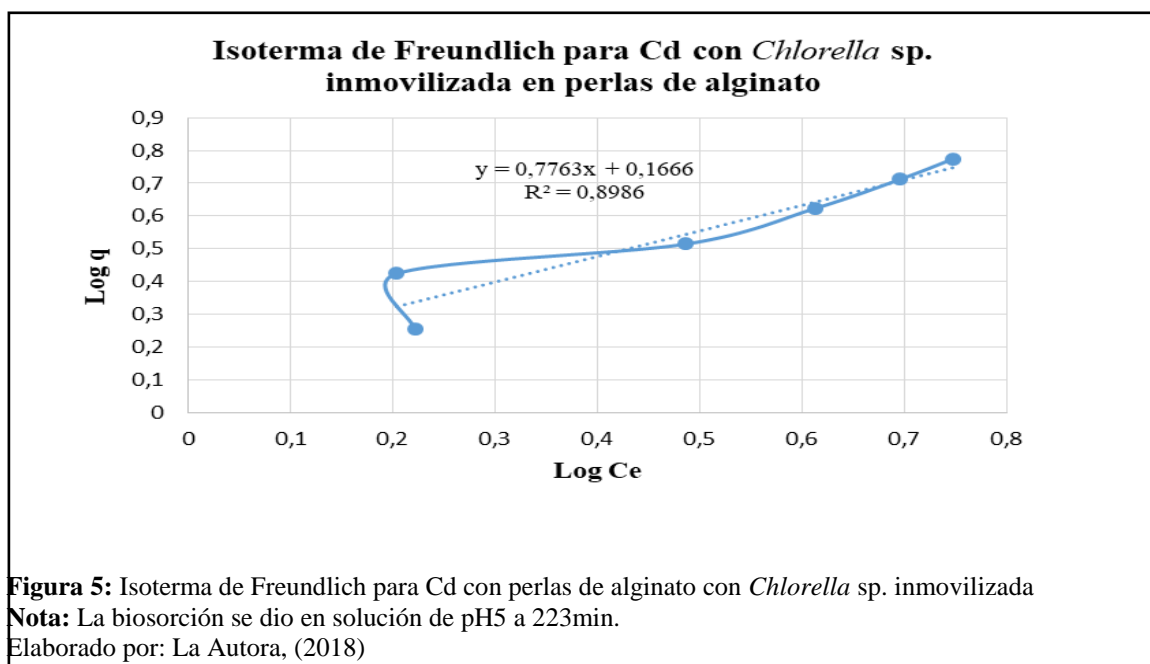


Figura 4: Isoterma de Langmuir para Cd sin *Chlorella* sp. con perlas de alginato
Nota: La biosorción se dio en concentraciones iniciales de (5; 8; 11; 14; 17; 20) mg/mL de Cd durante 223 min., a pH5.
 Elaborado por: La Autora, (2018)

El modelo de isothermas de Freundlich (Figura 5 y figura 6) representa la variación isotérmica de adsorción de una cantidad adsorbida por unidad de masa de adsorbente sólido (Manchola, 2012), describiendo la adsorción en superficies heterogéneas ya que este no se limita a la formación de monocapa (Bulgariu & Bulgariu, 2012). La isoterma de Freundlich se obtuvo utilizando la ecuación 3, en el caso del tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. el valor de $n= 1,288$ demostró que existe una afinidad significativa ($n>1$) del adsorbente por el sorbato, en otras palabras existe afinidad de la biomasa de perlas de alginato con *Chlorella* sp. por el cadmio y el valor de la constante de Freundlich $K_F= 1,468$ confirma que la capacidad de adsorción del biosorbente es significativa ($K>1$). Al igual que en el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp. los valores de $n= 1,639$ y $K_F = 1,620$, ambos son mayores a 1, lo que demuestran que existe una afinidad significativa del adsorbente por el sorbato y que la capacidad de adsorción del biosorbente es significativa.

Analizando los valores de correlación (R^2) de las isothermas de Freundlich, el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp. se ajusta favorablemente a este modelo $R^2= 0,9289$ (figura 6), a comparación del valor del tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. cuyo ajuste es ligeramente menor ($R^2=0,8986$). El nivel de ajuste de éste ensayo pudo haber sido mejorado al eliminar el primer dato de la curva que se muestra atípico (Figura 5) y que disminuye el ajuste de la linealidad de la isoterma, sin embargo, el conservar o eliminar este valor de la curva, no afecta a las conclusiones de afinidad significativa del adsorbente por el sorbato y de la capacidad significativa de adsorción del biosorbente puesto que en cualquiera de los dos escenarios, estos seguirían siendo mayores a 1.



Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, con el software estadístico Infostat versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008) confirmando que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con y sin *Chlorella* sp. en la perlas ($P > 0,05$) y de igual forma en la prueba de Tukey se comprueba por las medias obtenidas que no hay diferencia estadística (Anexo 8).

3.7 Comparación de biosorción de cadmio entre perlas de *Chlorella* sp. inmovilizada, perlas de alginato sin *Chlorella* sp. y *Chlorella* sp. libre.

Utilizando la misma densidad celular 3×10^7 cel/mL y los factores óptimos previamente determinados para los ensayos, se realizó una comparación de los biosorbentes con perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. inmovilizada vs. *Chlorella* libre, a diferentes concentraciones iniciales de metal en la solución acuosa (5, 8, 11, 14, 17 y 20 mg/mL) como se puede observar en la figura 7.

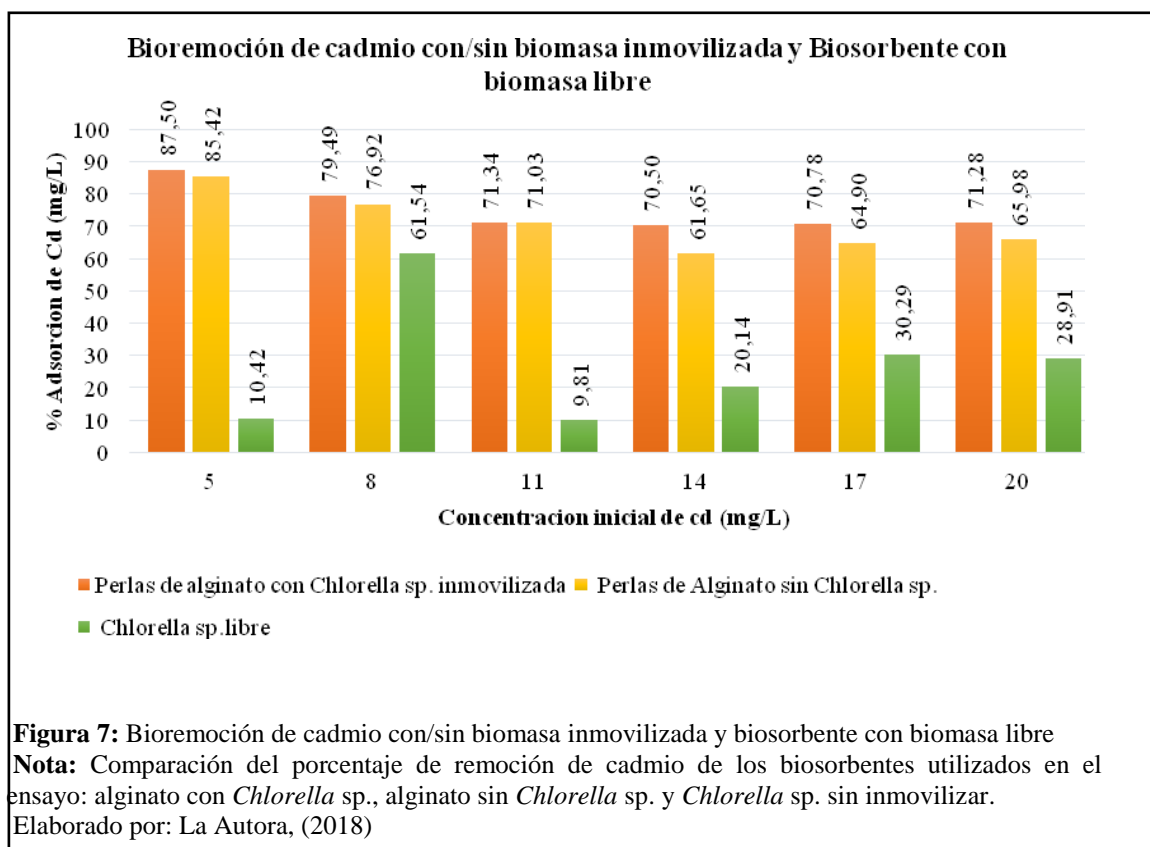
Se puede indicar que las capacidades de bioadsorción aumentan al disminuir la concentración inicial de cadmio en el medio de adsorción, esto se debe a que la microalga actúa mejor en concentraciones bajas de metales (Cuizano & Navarro, 2008), (Jimeno, Mercado, Ballesteros, Yépez, & Vega, 2017).

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, mediante el software estadístico Infostat versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008) para los tres tratamientos se confirmó que si existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los tratamientos con perlas de alginato y el tratamiento de células libres. Sin embargo, no hay diferencia estadística entre los tratamientos con perlas de alginato, a pesar de que las perlas de alginato con *Chlorella* sp. tiene un valor mayor de la media (Anexo 8). No obstante, como se dijo anteriormente, si se eleva la concentración celular de *Chlorella* sp. en las perlas se espera que pueda incrementar la remoción de metal, de manera que estas perlas se podrían emplear exitosamente en tratamientos de adsorción de cadmio.

Como se pudo observar, los tratamientos con células inmovilizadas obtuvieron mejores resultados que los ensayos con células libres, comprobando que tienen mayor capacidad de retención para la remoción de metales, esto respondería a la acción adicional del alginato. De hecho, se ha reportado que las células de *Chlorella* se vuelven metabólicamente más activas que las células libres (de-Bashan & Bashan, 2010), lo que podría favorecer los procesos de remoción de metales.

Se han reportado varios estudios comparando el uso de microorganismos inmovilizados y en estado libre como el proceso inmovilizado de *Bacillus subtilis* como biosorbente para la eliminación de un tinte aniónico, el estado inmovilizado aumentó la resistencia a la transferencia de masa entre el adsorbente y el adsorbato, produciendo mejores resultados que el uso del adsorbente en estado libre (Binupriya, Sathishkumar, Ku, & Yun, 2010). En otro estudio compararon la degradación del tributil fosfato por parte de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* inmovilizadas y en células libres, reportando que la degradación es mucho mejor en forma inmovilizada que como células libres (Hernández-Ruiz, Álvarez-Orozco, & Ríos-Osorio, 2017), también *Scenedesmus quadricauda* fue utilizada para la absorción de zinc y cadmio en aguas residuales industriales, mediante células libre e inmovilizadas en alginato, donde resultó que la absorción máxima por las células inmovilizadas eran 1,4 y 1,6 veces mayores que los de las células libres (Awasthi & Rai, 2006)

Sin embargo, cabe destacar que se pudo comprobar que *Chlorella* sp. libre puede remover el metal por si sola y que la biomasa inmovilizada permite el proceso de adsorción con mayor eficiencia.



3.8 Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad resultó positiva, puesto que durante diez días la coloración de las perlas aumentó intensificándose el color verde característico de la microalga *Chlorella* sp. esto se debe al aumento de la densidad celular dentro de la esfera (Forero-Cujiño et al., 2016), como se puede observar en la figura 8.

También se observó que pasado los 15 días, las perlas empezaron a romperse esto puede deberse a que la microalga ya no tenía el espacio suficiente dentro de la matriz del polímero, concordando con el análisis de Forero-Cujiño et al., (2016) que trabajó con *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus ovalternus* inmovilizados en alginato de calcio donde evidenció que después de diez días de cultivo las esferas de alginato con la microalga empezaron a disolverse.

Prueba de viabilidad

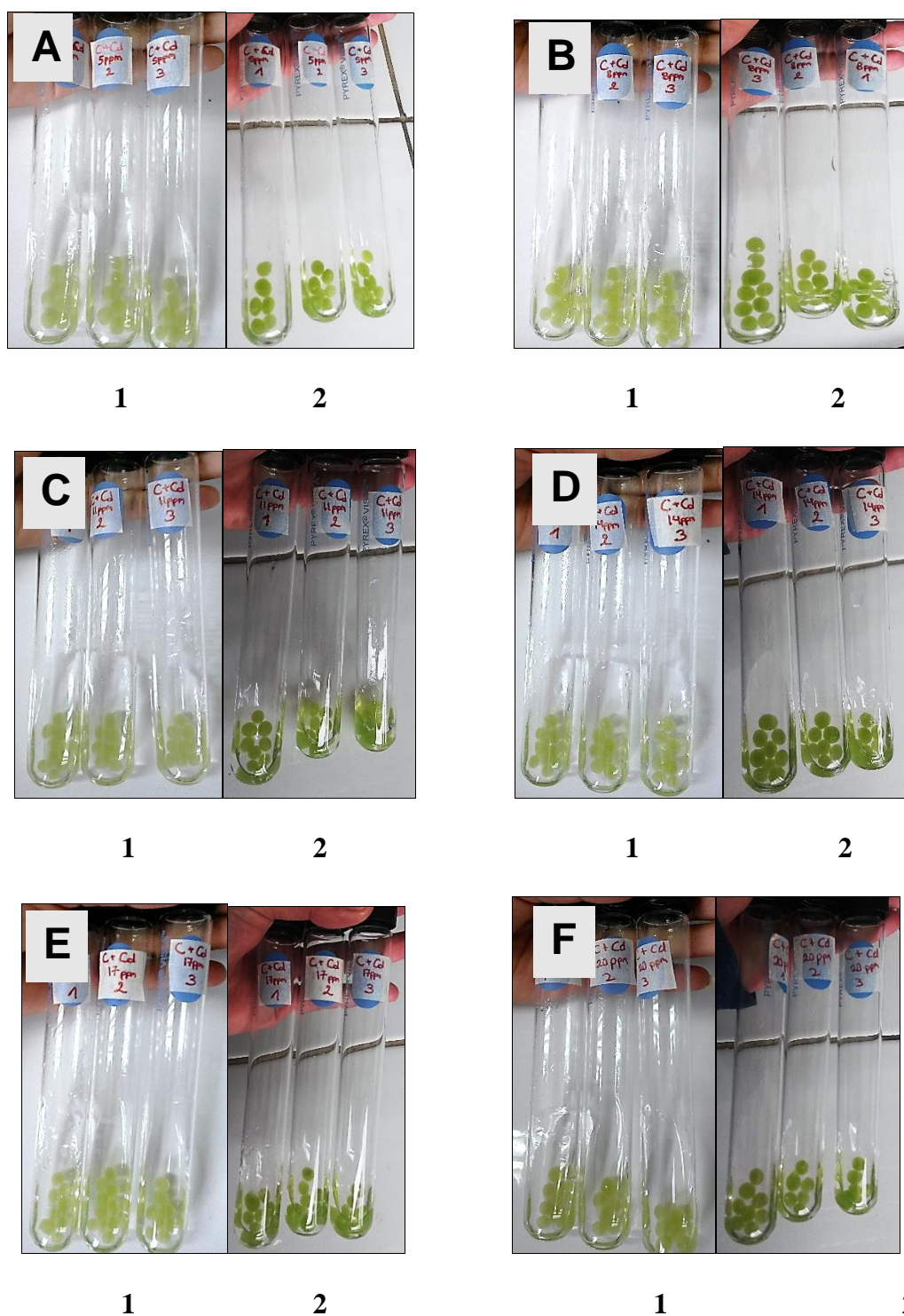


Figura 8. Prueba de viabilidad

Nota: *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato ubicadas en soluciones de (A) 5,0 (B) 8,0 (C) 11,0 (D) 14,0 (E) 17,0 (F) 20,0 mg/L de cadmio. De izquierda a derecha se observa la viabilidad de la biomasa inmovilizada después de diez días, día 1 (1) y día 10 (2)

Fuente: La Autora, (2018)

Conclusiones

Al determinar el efecto de pH en las soluciones se estableció que si hay diferencia significativa ($p < 0.05$) para los tratamientos con y sin *Chlorella* sp. inmovilizada pero, analizando entre los valores de pH 5 y 6 no hubo diferencia significativa demostrando que los dos tratamientos actúan de la misma forma, esto se puede atribuir a que el rango estudiado es muy corto, sin embargo, se optó por tomar como óptimo el pH 5 debido a que a este valor la solución es más estable.

Se estableció que el tiempo óptimo de contacto de es de 223 min ya se observó mayor absorción del metal.

En el ensayo de concentración óptima de células de *Chlorella* sp. para la adsorción de cadmio no presentó diferencia significativa entre tratamientos (perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp), pero si hubo diferencia entre las diferentes concentraciones de *Chlorella* sp. empleadas, siendo la mayor concentración (3×10^7 cel/mL) la que presentó mejor adsorción. Por lo que se espera que a mayor concentración de células podría haber mayor adsorción del metal.

Los datos experimentales de la bioadsorción de Cd con el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. se ajustaron favorablemente al modelo de Langmuir con coeficiente de correlación (R^2) de 0,9118 y obteniendo una concentración máxima de retención de Cd (q_m) de 5,640 mg por gramo de perla de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada (biosorbente), a un tiempo óptimo de 223 min y a pH 5 (pH óptimo) mientras que para el tratamiento de perlas de alginato sin *Chlorella* sp., los datos experimentales de la bioadsorción de Cd se ajustaron favorablemente a los dos

modelos de Langmuir y Freundlich, con coeficiente de correlación (R^2) de 0,929 y 0,918 respectivamente y un q_m de 5,356 mg por gramo de perla de alginato (biosorbente).

El equilibrio de la biosorción ocurre bajo un modelo de monocapa conforme las isothermas de Langmuir y como una biosorción de superficie heterogénea para las isothermas de Freundlich mostrando que en ambos tratamientos existe afinidad entre el sorbato y el sorbente.

La biosorción con células de *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato resulta más eficiente que la biosorción de *Chlorella* sp. libre.

La prueba de viabilidad resultó positiva, puesto que durante diez días la coloración de las perlas aumentó intensificándose el color verde característico de la microalga *Chlorella* sp. confirmando el aumento de la densidad celular dentro de la esfera.

Tanto el tratamiento de *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato como las perlas de alginato sin *Chlorella* sp. se podrían emplear para procesos de biorremediación con cadmio. Sin embargo, se espera que si se eleva la concentración celular de *Chlorella* sp. en las perlas se pueda incrementar la remoción de metal, de manera que estas perlas se podrían emplear exitosamente en tratamientos de remoción de cadmio.

Recomendaciones

Utilizar alginato de sodio de grado alimenticio de alta densidad para la elaboración de las perlas, puesto que inicialmente se intentó utilizar alginato de baja densidad pero la pasta de alginato no obtuvo la consistencia adecuada para su formación.

Almacenar las perlas a temperatura ambiente mínimo un día antes de su uso para que se climaticen y se solidifiquen completamente.

Dar mantenimiento al equipo de absorción atómica de aspiración directa y calibrar el mismo cada vez que se utiliza para obtener resultados fidedignos.

Trabajar con adecuados valores de pH de las soluciones para evitar problemas de precipitación.

Realizar ensayos del efecto tóxico del metal sobre *Chlorella* sp. para conocer como afectan diferentes concentraciones de Cd en su desarrollo.

Estimar, a futuro, la concentración de sitios de adsorción en la microalga *Chlorella* sp. a partir de la cantidad de metal adsorbido y el tamaño del metal, para futuros ensayos, comprobando si esta densidad cambia con el pH.

Referencias Bibliográficas

- Aksu, Z., & Dönmez, G. (2006). Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochemistry*, 41(4), 860-868. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.025>
- Al-Qodah, Z., Al-Shannag, M., Amro, A., Assirey, E., Bob, M., Bani-Melhem, K., & Alkasrawi, M. (2017). Impact of surface modification of green algal biomass by phosphorylation on the removal of copper(II) ions from water. *TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY*, 41, 190-208. <https://doi.org/10.3906/kim-1605-38>
- Awasthi, M., & Rai, L. C. (2006). Interactions between zinc and cadmium uptake by free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 34(1-2), 20-26. <https://doi.org/10.1002/aheh.200400607>
- Binupriya, A. R., Sathishkumar, M., Ku, C. S., & Yun, S. I. (2010). Biosorption of Procion Red MX 5B by *Bacillus subtilis* and Its Extracellular Polysaccharide: Effect of Immobilization. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 38(8), 775-780. <https://doi.org/10.1002/clen.200900279>
- Bulgariu, D., & Bulgariu, L. (2012). Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresource Technology*, 103(1), 489-493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.016>
- Caizapanta A., D. (2012). Estudio isotérmico de biosorción de cromo y cadmio en solución acuosa utilizando residuos de césped. Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/1348>

- Cataldo, S., Cavallaro, G., Gianguzza, A., Lazzara, G., Pettignano, A., Piazzese, D., & Villaescusa, I. (2013). Kinetic and equilibrium study for cadmium and copper removal from aqueous solutions by sorption onto mixed alginate/pectin gel beads. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(4), 1252-1260. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.09.012>
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159-182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Covarrubias, S. A., & Cabriaes, J. J. P. (2017). CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES PESADOS EN MÉXICO: PROBLEMÁTICA Y ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(0), 7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
- Cruz, E. (2013). Eliminación de cadmio (II) en agua mediante el uso de biomasa de pomelo (*Citrus paradisi* L.) en estado natural y protonado : Isotermas y cinética de adsorción. Recuperado de <http://repositorio.upct.es/handle/10317/3192>
- Cuizano, N., & Navarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: Posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, ISSN 1575-3417, N°. 2, 2008, pags. 120-125, 104.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18), 4311-4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)

- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Basarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). Infostat-Programa Estadístico (Versión 2008) [Estadístico]. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo Infostat.
- Edris, G., Alhamed, Y., & Alzahrani, A. (2014). Biosorption of Cadmium and Lead from Aqueous Solutions by *Chlorella vulgaris* Biomass: Equilibrium and Kinetic Study. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 39(1), 87-93. <https://doi.org/10.1007/s13369-013-0820-x>
- Feksa, L. R., Troian, E. A., Muller, C. D., Viegas, F., Machado, A. B., & Rech, V. C. (2018). Chapter 11 - Hydrogels for biomedical applications. En A. M. Grumezescu (Ed.), *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs* (pp. 403-438). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00011-9>
- Forero Montilla, A. P. (2015). Fundamento teórico sobre tratamiento de aguas residuales por fitorremediación. Recuperado de <http://repository.unimilitar.edu.co/handle/10654/13266>
- Forero-Cujiño, M. A., Ruiz, L. C. M., Pinilla-Agudelo, G. A., & Muñoz, L. M. M.-. (2016). INMOVILIZACIÓN DE LAS MICROALGAS *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) Y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) EN ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 437-442.

- García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud, 8.
- García-Rojas, N., Villanueva-Díaz, P., Campos-Medina, E., & Velázquez-Rodríguez, A. (2012). Análisis de la adsorción como método de pulimiento en el tratamiento de aguas residuales. *Quivera Revista de Estudios Territoriales*, 14(1), 109-129.
- Gaviño, C., & Stephanie, C. (2016). Evaluación comparativa de dos tipos de floculantes para la cosecha de biomasa de microalgas a escala piloto. Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5883>
- Guamán, M. C., & González, N. P. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador* (Lucia Re de Guillén, Vol. 1). Quito-Ecuador. Recuperado de <http://axiomastudio.net/cie-energia/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hernández-Ruiz, G. M., Álvarez-Orozco, N. A., & Ríos-Osorio, L. A. (2017). Bioremediation of organophosphates by fungi and bacteria in agricultural soils. A systematic review. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(1), 138-159. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:564
- Indhumathi, P., Syed, S., Shoba, U. S., & Saraswathy, C. P. (2014). The removal of chromium from aqueous solution by using green micro algae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(6), 799-808.
- Jimeno, V. A. V., Mercado, E. R. A., Ballesteros, D. M. P., Yépez, J. G. T., & Vega, M. E. P. (2017). Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la

- decoloración del agua residual de una empresa textil/Using the microalgae *Chlorella* sp. live suspended in decoloration wastewater from a textile factory. *Prospectiva*, 15(1), 93-99. <https://doi.org/10.15665/rp.v15i1.829>
- Khan, I., Al-Khaldi, F., Abusharkh, B., Khaled, M., ATIEH, M., S. Nasser, M., ... Gupta, V. (2015). Adsorptive removal of cadmium(II) ions from liquid phase using acid modified carbon-based adsorbents. *Journal of Molecular Liquids*, 204, 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.01.033>
- Lazo, J. C., Navarro, A. E., Sun-Kou, M. R., & Llanos, B. P. (2008). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ARCILLAS ORGANOFÍLICAS Y SU APLICACIÓN COMO ADSORBENTES DEL FENOL, 17.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Luz, A., Velasco, J., Helena Barros-Gómez, G., Ospina, G., & Alberto Trujillo, C. (2009). EFECTO DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA, TEMPERATURA Y SALINIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Isochrysis galbana* (CLON T-ISO) EFFECT OF LIGHT INTENSITY, TEMPERATURE AND SALINITY ON THE GROWTH OF *Isochrysis galbana* (T-ISO).
- Manchola, A. P. (2012). Estudio isotérmico de biosorción de cadmio, cromo, plomo y zinc en solución acuosa empleando el pinzote (ranqui) de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4065>
- Mead, M. N. (2011). Confusión por el cadmio ¿Los consumidores necesitan protección? *Salud Pública de México*, 53(2), 178-186.

- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28(2), 299-311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), 3949-3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Ortiz- Moreno, M. L., Cortés - Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Otero-Paternina, A. M., & Padilla, J. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11. <https://doi.org/10.22579/20112629.224>
- Pérez, S., & Marcus, D. (2015). Metodología de alto rendimiento para evaluar contenido de lípidos y producción de biomasa en microalgas. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5644>
- Perpetuo, E. A., Souza, C. B., & Nascimento, C. A. O. (2011). Engineering bacteria for bioremediation. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering from Analysis and Modeling to Technology Applications*, 605-632.
- Petrovič, A., & Simonič, M. (2016). Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(7), 1761-1780. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1015-2>
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., & Godlewska-Żyłkiewicz, B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and

toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 52, 52-65.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.009>

Plaza Cazón, J. (2012). *Remoción de metales pesados empleando algas marinas* (Tesis). Facultad de Ciencias Exactas. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10915/2770>

Prasanna Kumar, Y., King, P., & Prasad, V. S. R. K. (2007). Adsorption of zinc from aqueous solution using marine green algae—*Ulva fasciata* sp. *Chemical Engineering Journal*, 129(1), 161-166.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.10.023>

Rao, M. M., Ramesh, A., Rao, G. P. C., & Seshiah, K. (2006). Removal of copper and cadmium from the aqueous solutions by activated carbon derived from *Ceiba pentandra* hulls. *Journal of Hazardous Materials*, 129(1-3), 123-129.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.08.018>

Rivas, C. F., Núñez, O., Longoria, F., & Gonzalez, L. (2014). Isoterma de langmuir y freundlich como modelos para la adsorción de componentes de ácido nucleico sobre WO₃. *Saber*, 26(1), 43-49.

Rodriguez-Estupinan, P., Giraldo, L., & Moreno-Pirajan, J. C. (2010). Adsorción simple y competitiva de níquel y cadmio sobre carbón activado granular: efecto del pH. *Afinidad*, 67(550). Recuperado de <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/269638>

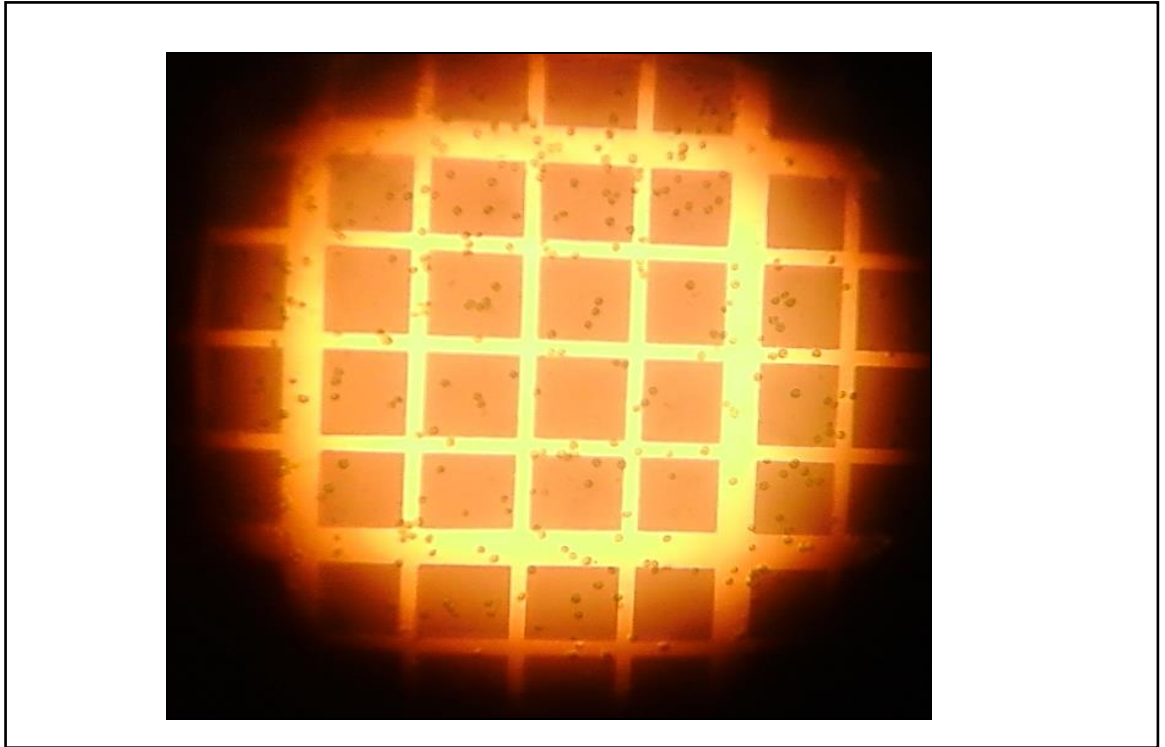
Rubio, Diego Ivan Caviades, Calderón, R. A. M., Gualtero, A. P., Acosta, D. R., & Sandoval, J. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Ingeniería y Región*, (13), 73-90.

- Rubio, Diego Iván Caviades, Delgado, D. R., & Amaya, A. O. (2017). Remoción de metales pesados comúnmente generados por la actividad industrial, empleando macrófitas neotropicales. *Producción + Limpia*, 11(2). Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/1245>
- Ruiz Martinez, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Recuperado de <https://riunet.upv.es/handle/10251/12831>
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99. <https://doi.org/10.21615/210>
- Sandoval-Ibarra, F. D., López-Cervantes, J. L., & Gracia-Fadrique, J. (2015). Ecuación de Langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química*, 26(4), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.03.002>
- SENESCYT. (2015). Biosorción, una alternativa para reducir la contaminación [Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación]. Recuperado 11 de diciembre de 2017, de <http://prometeo.educacionsuperior.gob.ec/biosorcion-una-alternativa-para-reducir-la-contaminacion/>
- Singh, L., Pavankumar, A. R., Lakshmanan, R., & Rajarao, G. K. (2012). Effective removal of Cu²⁺ ions from aqueous medium using alginate as biosorbent. *Ecological Engineering*, 38(1), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.10.007>
- Stephens, E., Ross, I. L., Mussgnug, J. H., Wagner, L. D., Borowitzka, M. A., Posten, C., ... Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel

- production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10), 554-564.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.003>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., & Shin, K.-H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329-352.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Tüzün, İ., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., & Arica, M. Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management*, 77(2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.028>
- USGS. (2008). Mineral Commodity Summaries, 202.
- Villanueva, R. O. C. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131-143.
- Wan Maznah, W. O., Al-Fawwaz, A. T., & Surif, M. (2012). Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences*, 24(8), 1386-1393. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60931-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60931-5)
- Zhang, X., Zhao, X., Wan, C., Chen, B., & Bai, F. (2016). Efficient biosorption of cadmium by the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1. *Algal Research*, 16, 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.002>

Anexos

Anexo 1: Células de *Chlorella* sp. en cámara de Neubauer.



Nota: Vista al microscopio en aumento de 40X.
Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 2: Análisis estadístico del ensayo de tiempo de contacto.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Adsorción de Cd en solucio..	96	0,96	0,95	3,79	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	440,42	23	19,15	82,48	<0,0001
Tratamiento	440,42	23	19,15	82,48	<0,0001
Error	16,72	72	0,23		
Total	457,14	95			

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Adsorción de Cd en solucio..	96	0,96	0,95	3,79	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	440,42	23	19,15	82,48	<0,0001
Tiempo	426,89	11	38,81	167,17	<0,0001
Chlorella	1,65	1	1,65	7,12	0,0094
Tiempo*Chlorella	11,88	11	1,08	4,65	<0,0001
Error	16,72	72	0,23		
Total	457,14	95			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,81376					
Error: 0,2322 gl: 72					
Tiempo	Medias	n	E.E.		
20	7,98	8	0,17	A	
40	9,85	8	0,17	B	
60	10,65	8	0,17	B	
80	12,10	8	0,17		C
100	12,81	8	0,17		C D
120	12,93	8	0,17		D
140	13,41	8	0,17		D E
160	14,09	8	0,17		E F
180	14,24	8	0,17		F
200	14,46	8	0,17		F G
240	14,64	8	0,17		F G
220	15,28	8	0,17		G
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Nota: Análisis de varianza del ensayo de tiempo de contacto entre los tratamientos de perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. y análisis de varianza con variables de clasificación tiempo y presencia o ausencia de *Chlorella* en los tratamientos y la interacción entre variables.
Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 3: Prueba de rango post hoc de Tukey para el ensayo de tiempo óptimo de contacto

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19606				
Error: 0,2322 gl: 72				
	Chlorella	Medias n	E.E.	
P.Alginato sin Chlorella	12,57	48	0,07	A
P.Alginato con Chlorella	12,83	48	0,07	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)				
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,28841				
Error: 0,2322 gl: 72				
Tiempo	Chlorella	Medias n	E.E.	
20	P.Alginato con Chlorella	7,30	4 0,24	A
20	P.Alginato sin Chlorella	8,65	4 0,24	B
40	P.Alginato sin Chlorella	9,75	4 0,24	B C
40	P.Alginato con Chlorella	9,95	4 0,24	C
60	P.Alginato con Chlorella	10,58	4 0,24	C D
60	P.Alginato sin Chlorella	10,73	4 0,24	C D
80	P.Alginato sin Chlorella	11,83	4 0,24	D E
80	P.Alginato con Chlorella	12,38	4 0,24	E F
100	P.Alginato sin Chlorella	12,75	4 0,24	E F G
120	P.Alginato sin Chlorella	12,83	4 0,24	E F G H
100	P.Alginato con Chlorella	12,88	4 0,24	E F G H
120	P.Alginato con Chlorella	13,03	4 0,24	E F G H I
140	P.Alginato sin Chlorella	13,25	4 0,24	F G H I J
140	P.Alginato con Chlorella	13,58	4 0,24	F G H I J
200	P.Alginato sin Chlorella	13,98	4 0,24	G H I J K
160	P.Alginato con Chlorella	14,08	4 0,24	H I J K
160	P.Alginato sin Chlorella	14,10	4 0,24	H I J K
180	P.Alginato sin Chlorella	14,23	4 0,24	I J K
180	P.Alginato con Chlorella	14,25	4 0,24	I J K
220	P.Alginato sin Chlorella	14,38	4 0,24	J K
240	P.Alginato sin Chlorella	14,40	4 0,24	J K
240	P.Alginato con Chlorella	14,88	4 0,24	K
200	P.Alginato con Chlorella	14,95	4 0,24	K L
220	P.Alginato con Chlorella	16,18	4 0,24	L

Nota: Se analizaron 12 tiempos para cada tratamiento (con y sin *Chlorella* sp.)
Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 4: Análisis estadístico del ensayo de pH.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Adsorción de Cd (mg/g)	24	0,61	0,44	2,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,82	7	0,26	3,59	0,0163
Tratamiento	1,82	7	0,26	3,59	0,0163
Error	1,16	16	0,07		
Total	2,98	23			

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Adsorción de Cd (mg/g)	24	0,61	0,44	2,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,82	7	0,26	3,59	0,0163
Chlorella	0,38	1	0,38	5,17	0,0371
Ph	0,04	1	0,04	0,57	0,4594
Tiempo	0,88	1	0,88	12,16	0,0030
Chlorella*Ph	0,17	1	0,17	2,30	0,1490
Chlorella*Tiempo	0,17	1	0,17	2,30	0,1490
Ph*Tiempo	0,11	1	0,11	1,47	0,2428
Chlorella*Ph*Tiempo	0,08	1	0,08	1,13	0,3043
Error	1,16	16	0,07		
Total	2,98	23			

Nota: Análisis de varianza del ensayo de pH entre los tratamientos de perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. y análisis de varianza con sus respectivas interacciones (tiempo, presencia o ausencia de *Chlorella* sp. vs.pH, presencia o ausencia de *Chlorella* sp. vs.tiempo, pH vs. tiempo y presencia o ausencia de *Chlorella* sp. vs.tiempo y pH).

Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 5: Prueba de Tukey del ensayo de pH óptimo.

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23303

Error: 0,0725 gl: 16

Chlorella	Medias	n	E.E.	
P. alginato sin Chlorella	12,13	12	0,08	A
P. alginato con Chlorella	12,38	12	0,08	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23303

Error: 0,0725 gl: 16

Ph	Medias	n	E.E.	
6	12,21	12	0,08	A
5	12,29	12	0,08	A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23303

Error: 0,0725 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
166	12,06	12	0,08	A
223	12,44	12	0,08	B

Nota: Prueba de Tukey del ensayo de pH óptimo, comparando las variables de presencia o ausencia de biomasa microalgal inmovilizada en perlas de alginato, prueba de Tukey entre variables de pH de la solución y prueba de Tukey entre variables de tiempo de contacto.
Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 6: Prueba de Tukey del ensayo de pH óptimo, comparando las variables de interacción

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,44476

Error: 0,0725 gl: 16

Chlorella	Tiempo	Medias	n	E.E.	
P. alginato sin Chlorella	166	12,02	6	0,11	A
P. alginato con Chlorella	166	12,10	6	0,11	A
P. alginato sin Chlorella	223	12,23	6	0,11	A B
P. alginato con Chlorella	223	12,65	6	0,11	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,44476

Error: 0,0725 gl: 16

Ph	Tiempo	Medias	n	E.E.	
5	166	12,03	6	0,11	A
6	166	12,08	6	0,11	A
6	223	12,33	6	0,11	A B
5	223	12,55	6	0,11	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,76115

Error: 0,0725 gl: 16

Chlorella	Ph	Tiempo	Medias	n	E.E.	
P. alginato sin Chlorella	6	166	11,90	3	0,16	A
P. alginato con Chlorella	5	166	11,93	3	0,16	A
P. alginato sin Chlorella	6	223	12,10	3	0,16	A B
P. alginato sin Chlorella	5	166	12,13	3	0,16	A B
P. alginato con Chlorella	6	166	12,27	3	0,16	A B
P. alginato sin Chlorella	5	223	12,37	3	0,16	A B
P. alginato con Chlorella	6	223	12,57	3	0,16	A B
P. alginato con Chlorella	5	223	12,73	3	0,16	B

Nota: Las variables de interacción son entre presencia o ausencia de *Chlorella* sp. vs. tiempo de contacto, pH vs. tiempo de contacto y entre presencia o ausencia de *Chlorella* sp. vs. pH y tiempo de contacto.

Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 7: Análisis estadístico del ensayo de concentración celular óptima.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Adsorción de Cd (mg/mL)	12	0,19	0,11	2,20	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,23	1	0,23	2,41	0,1515
Chlorella	0,23	1	0,23	2,41	0,1515
Error	0,97	10	0,10		
Total	1,20	11			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46237					
Error: 0,0969 gl: 10					
Chlorella		Medias	n	E.E.	
P. alginato sin Chlorella		13,93	3	0,18	A
P. alginato con Chlorella		14,26	9	0,10	A

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Adsorción de Cd (mg/mL)	9	0,70	0,59	1,10	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,34	2	0,17	6,86	0,0281
Tratamiento	0,34	2	0,17	6,86	0,0281
Error	0,15	6	0,02		
Total	0,48	8			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39169					
Error: 0,0244 gl: 6					
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
1	14,00	3	0,09	A	
2	14,30	3	0,09	A	B
3	14,47	3	0,09	B	

Nota: Análisis de varianza de los tratamientos de concentración celular óptima en las perlas de alginato para la biosorción de cadmio y análisis de varianza entre las concentraciones de *Chlorella* sp. (Concentración 1= 3×10^6 , Concentración 2 = $1,6 \times 10^7$, Concentración 3= 3×10^7).
Elaborado por: La Autora, (2018)

Anexo 8: Análisis estadístico del ensayo de adsorción de cadmio con biomasa inmovilizada, biomasa libre y alginato sin biomasa.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Adsorción de Cd (mg/mL)	36	0,01	0,00	37,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,00	1	3,00	0,28	0,5980
Chlorella	3,00	1	3,00	0,28	0,5980
Error	360,50	34	10,60		
Total	363,50	35			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,20580

Error: 10,6028 gl: 34

Chlorella	Medias	n	E.E.
P. alginato sin Chlorella	8,38	18	0,77 A
P. alginato con Chlorella	8,96	18	0,77 A

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Adsorción de Cd mg/Ml	54	0,42	0,40	43,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	337,97	2	168,98	18,58	<0,0001
Chlorella	337,97	2	168,98	18,58	<0,0001
Error	463,90	51	9,10		
Total	801,87	53			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,42683

Error: 9,0961 gl: 51

Chlorella	Medias	n	E.E.
Chlorella libre	3,38	18	0,71 A
P. alginato sin Chlorella	8,38	18	0,71 B
P. alginato con Chlorella	8,96	18	0,71 B

Nota: Análisis de varianza y prueba de Tukey del ensayo de adsorción de cadmio con perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. y análisis de varianza con prueba de Tukey entre los tratamientos inmovilizados en alginato y el tratamiento de células libres.

Elaborado por: La Autora, (2018)